

Résumés des projets autorisés utilisant des animaux à des fins scientifiques

Premier semestre 2019 (du 2 janvier 2019 au 30 juin 2019)

10555 Les Leucémies Myéloïdes Aiguës (AML) constituent un groupe de cancers hématologiques caractérisés par une accumulation anormale de cellules immatures, appelées blastes, au niveau du sang et de la moelle osseuse. Cette dernière ne peut alors plus fonctionner correctement et assurer la production des cellules sanguines normales. Une AML peut survenir à tout âge : c'est un cancer fréquent chez les enfants en bas âge mais son incidence s'accroît essentiellement après 40 ans. En absence de traitements, l'AML est une maladie foudroyante dont l'issue est fatale en quelques semaines ou quelques mois. Au cours des dernières décennies, l'essentiel des avancées thérapeutiques dans le traitement de l'AML a reposé sur l'intensification des doses de chimiothérapie administrées et le développement des techniques de greffe de moelle osseuse. En effet, les traitements classiques combinent une chimiothérapie et une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Chez les patients atteints, la chimiothérapie proposée est généralement efficace, mais à court terme seulement puisqu'environ 80 % des patients rechutent rapidement. La greffe de moelle osseuse est préconisée pour les patients en première rémission complète et à haut risque de rechute, de même pour les patients en seconde rémission complète. Pour tous les autres, les médecins étudient la question de la greffe au cas par cas, lors du bilan initial et de la réponse à la chimiothérapie, mais restent limités par la disponibilité d'un donneur compatible et par l'âge du patient. La survie moyenne sur 5 ans reste donc de seulement 10 à 20% chez les patients de plus de 60 ans, de 40% chez les patients de moins de 60 ans et 30% des enfants et adolescents atteints continuent de mourir chaque année de cette maladie.

L'objectif de ce projet est d'obtenir des modèles précliniques qui soient le plus représentatif possible des différents types d'AML de l'adulte et de l'enfant afin de proposer à l'industrie du médicament des outils d'évaluation pour développer des traitements plus adaptés et plus efficaces que les traitements existants.

Les greffes de tumeurs de patients sur souris, ou PDX (Patient Derived tumor Xenografts), sont les modèles qui, à l'heure actuelle, permettent au mieux de récapituler les caractéristiques des cancers humains en reproduisant toutes les étapes et aspects de la pathologie. Les modèles PDX d'origine hématologique fournissent les mêmes avantages que les modèles PDX de tumeurs solides, tels que la préservation de l'hétérogénéité et une réelle corrélation avec les réponses cliniques obtenus chez les patients.

Notre intention est d'établir 20 modèles de PDX AML (10 modèles adultes et 10 modèles pédiatriques) sur 2 ans. L'établissement de ces modèles se fera dans le respect des lois en vigueur après obtention du consentement éclairé des malades. Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 1022 souris dans ce projet. Le nombre de souris utilisées se justifie par un processus de développement exigeant et nécessaire pour établir des modèles PDX AML fiables et utilisables comme modèles précliniques.

Dans un souci du respect de la règle des 3R (Remplacement-Réduction-Raffinement) :

- Les modèles PDX AML sont indispensables car ces modèles sont les seuls permettant de reconstituer sur animal la complexité des cancers hématologiques humains et bien que l'environnement cellulaire soit constitué de tissus de souris, ce sont sans doute les modèles qui s'approchent le plus de la maladie humaine.

- Le nombre d'animaux utilisés est le nombre minimum nécessaire pour développer 20 modèles PDX AML. De plus, le développement et la mise à disposition de modèles PDX représentants au

mieux l'hétérogénéité des différents types d'AML permettront une meilleure évaluation des médicaments antitumoraux entraînant une réduction globale du nombre d'animaux utilisés dans les études futures.

- Les souris seront regroupées au minimum par deux et au maximum par six dans des cages changées hebdomadairement et manipulées dans des conditions d'hygiène rigoureuse afin de garantir un statut sanitaire optimal. Les animaux seront monitorés quotidiennement (état physique et comportement) et le milieu est systématiquement enrichi avec du papier kraft, des bâtons de bois et des maisons en carton pourront être ajoutés. Afin d'atténuer le stress et la douleur infligés aux animaux, pour les modèles dont le pourcentage de prise de greffe en primo-implantation est élevé (>40%), des méthodes moins stressantes seront utilisées pour les développer (injection de busulfan, injection par voie intraveineuse) et pour les modèles dont le pourcentage de prise de greffe est faible, la greffe sera réalisée sous anesthésie. De plus, pour monitorer l'évolution de la leucémie et éviter l'apparition des signes cliniques associés, des prélèvements sanguins seront réalisés régulièrement et la progression du pourcentage de cellules leucémiques humaines dans le sang sera analysée rapidement.

10556 Le sepsis est l'état associé aux infections sévères chez l'homme et garde une mortalité importante malgré l'utilisation d'antibiotiques. Les causes de cette maladie ne sont pas bien décrites. Ces infections diffèrent selon l'organe infecté et le type de bactérie.

Dans ce projet, nous allons essayer de mieux comprendre l'origine de la mortalité lors du sepsis et de déterminer quel est le facteur principal de la mortalité entre la réponse de l'hôte (Homme) aux bactéries et l'effet direct des bactéries. Pour cela nous utiliserons différents modèles infectieux qui présentent chacun des caractéristiques propres :

1. Un modèle de ponction ligature caecale (CLP), modèle d'infection multi-bactérienne intra-abdominale (péritonite) reproduisant une perforation digestive (comme pour une appendicite).

2. Un modèle d'infection mono-bactérienne intra-abdominale (péritonite) par injection de bactéries mortes ou vivantes.

3. Un modèle d'injection d'une molécule présente au niveau de la surface bactérienne

4. Un modèle d'infection pulmonaire (une bactérie connue pour induire le sepsis chez l'homme via les poumons). Des résultats de notre laboratoire suggèrent que certaines molécules de l'hôte influencent sur la mortalité lors de sepsis. Pour cela, ces quatre modèles vont être effectués chez des souris qui expriment ou pas des molécules pro- inflammatoires (2 protéines) et anti-inflammatoires (une protéine) en présence ou pas des récepteurs aux anticorps anti-bactéries. Le phénotype de l'ensemble des souris utilisées dans ce projet est non dommageable.

Ce projet se déroulera sur une période de 5 ans.

Ce projet nécessitera un nombre total de 2592 souris.

La conformité avec les exigences de remplacement, réduction et raffinement seront pris en compte :

1) Remplacement ; les connaissances issues de cette étude *in vivo* ne peuvent pas être obtenues actuellement par d'autres méthodes compte-tenu de la complexité physiologique de la réponse inflammatoire qui nécessite de travailler à l'échelle d'un organisme. En revanche, nous avons établi des lignées cellulaires pour étudier les mécanismes *in vitro*.

2) Réduction, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant dans chaque sous-groupe pour avoir des résultats statistiquement exploitables à 6 par sous-groupe ; les expériences qui ont le même groupe contrôle sont effectuées en simultanément pour limiter le nombre des souris contrôles.

3) Raffinement, les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Une anesthésie sera effectuée lors des procédures douloureuses pour l'animal et l'utilisation d'antalgiques sera systématique si l'animal présente des signes de douleur au cours de l'expérimentation. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les animaux seront évalués à l'aide de points limites bien définis, entraînant l'arrêt anticipé de l'expérimentation si nécessaire.

A terme, ce projet pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques permettant de mieux prendre en charge le sepsis chez l'homme.

10557 L'ischémie critique des membres (CLI) est une complication grave de l'artérite des membres inférieurs, pathologie qui affecte entre 27 et 30 millions de patients en Europe et aux Etats-Unis. L'incidence de l'artérite progresse avec le diabète, le tabac et le vieillissement de la population. Les personnes atteintes souffrent de claudication, d'ulcères et dans certains cas de gangrène. En cas d'échec de la chirurgie de revascularisation, 40% des patients atteints de CLI devront subir une amputation, le taux de mortalité annuel excédant 20%.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) présentent un intérêt grandissant pour la médecine régénératrice et l'ingénierie tissulaire. Les principales sources de CSM chez les adultes sont la moelle osseuse, le tissu adipeux et la pulpe dentaire.

Les CSM présentent un grand intérêt thérapeutique et de nombreux avantages pour le traitement de pathologies vasculaires par formation de nouveaux vaisseaux. Elles pourraient constituer un complément, voire une alternative, à la chirurgie de revascularisation dans les cas d'ischémie.

L'objectif de l'étude est de quantifier l'effet de reperfusion *in vivo*, dans un modèle de souris d'ischémie des membres postérieurs, de trois (3) lots de cellules stromales mésenchymateuses (CSM) dérivées du cordon ombilical et administrées par injection intra-musculaire. Un tel procédé comprend une étape destinée à augmenter le potentiel de revascularisation des CSM. Ces mesures sont destinées à établir une corrélation avec l'effet de revascularisation de ces mêmes lots de CSM mesuré par ailleurs par un test *in vitro*.

Le mode d'administration, le schéma d'injection et la dose ont été choisis en fonction de l'utilisation clinique envisagée.

L'étude utilisera 64 souris immunodéficiences, à raison de 12 souris par groupe, ce nombre constituant le minimum requis (en évaluant les pertes à 40 % qu'elles soient dues à la mort des souris après chirurgie ou à une ischémie insuffisante (< 80 %) pour satisfaire aux objectifs de l'étude sur la base des pré-requis réglementaires et scientifiques.

Toutes les expériences seront conçues pour respecter le principe des 3R (réduction, raffinement et remplacement) pour l'utilisation des animaux en recherche.

Réduction : Le nombre d'animaux est réduit au strict minimum par calcul statistique – de plus, grâce au laser doppler, plusieurs mesures pourront être faites sur les mêmes animaux pour l'étude cinétique

Raffinement : De l'enrichissement sera ajouté dans la cage au moment du change et de la nourriture sera mise à disposition après la chirurgie afin de favoriser la récupération. Les animaux seront surveillés quotidiennement et pesés à minima une fois/semaine. Leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

Remplacement : Afin de soumettre cet outil de thérapie cellulaire à une demande d'autorisation d'essai clinique de phase I/IIa, visant à évaluer la tolérance locale et systémique d'implantations de CSM allogéniques chez des patients présentant une ischémie critique d'un membre inférieur et la recherche de signes d'efficacité, le recours à l'animal est indispensable.

Les résultats de l'étude chez l'animal seront intégrés dans une demande d'autorisation d'essai clinique de phase I/IIa, visant l'évaluation de la tolérance locale et systémique d'implantations de CSM allogéniques chez des patients présentant une ischémie critique d'un membre inférieur, ainsi que la recherche de signes d'efficacité.

10558 Chez l'homme, le cancer du pancréas est un cancer de plus en plus fréquent et de mauvais pronostic. Les traitements conventionnels de chimiothérapie et de radiothérapie restent décevants en raison de mécanismes de résistance induits par les tumeurs. Notre projet s'intéresse à la sensibilisation de la radiothérapie par un ensemble de molécules issues de l'alimentation et de molécules impliquées dans la réparation de l'ADN, dans l'objectif d'augmenter l'efficacité du traitement de radiothérapie sur le cancer du pancréas.

Nous étudierons des substances bio-actives issues de l'alimentation comme le resvératrol, la viniférine (issus de la vigne) et la capsaïcine (issue du piment) qui ont déjà montré individuellement un effet anti-cancéreux intéressant. Nous étudierons également des molécules comme l'acide valproïque (médicament utilisé comme anti-épileptique) qui inhibe la réparation de l'ADN.

Nous avons déjà montré *in vitro* l'effet radiosensibilisant de l'association de molécules comme le resvératrol, la capsaïcine et l'acide valproïque sur des cellules de cancer du pancréas.

Notre objectif est maintenant de valider cette sensibilisation à la radiothérapie *in vivo* pour se rapprocher du contexte physiologique humain.

Aussi, après de nombreuses expériences préliminaires *in vitro*, et après validation de nos modèles de greffe de tumeurs, nous devons valider nos modèles d'étude de radiothérapie sur un minimum d'animaux *in vivo*.

Pour cela, nous utiliserons un modèle de souris immunodéficientes afin d'implanter des cellules tumorales humaines et ainsi reproduire au plus près les conditions de formation de ces tumeurs chez l'homme. Nous utiliserons le minimum nécessaire d'animaux pour être statistiquement significatifs et scientifiquement irréprochables. L'ensemble des expériences impliquera différents lots d'animaux, dont le total sera de 324 sur 5 ans. Les animaux sont produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R. Dans le but de restreindre le nombre d'animaux nous implanterons deux tumeurs sous-cutanées par animal (une sur chaque flanc). Les lots témoins seront combinés. De plus, nous ferons des analyses bioinformatiques afin de limiter le nombre d'animaux nécessaires. En matière de raffinement, la douleur sera prise en charge de la naissance jusqu'à la mort de l'animal (utilisation d'analgésiques). L'environnement des animaux sera enrichi par des tunnels en polycarbonate.

Nous ne pouvons cependant pas remplacer l'expérimentation animale car le processus étudié est trop complexe pour être modélisé *in vitro* ou *in silico*.

10559 La réponse inflammatoire est une réponse physiologique de l'hôte à une agression tissulaire (infectieuse, traumatique, ...). Elle débute habituellement par une phase d'initiation avec libération précoce de médiateurs pro-inflammatoires, suivie d'une phase d'amplification et d'entretien pendant laquelle il existe une mobilisation et une activation de nombreuses cellules inflammatoires. En conditions physiologiques, la réponse inflammatoire est suivie d'une phase de résolution, avec disparition des cellules inflammatoires et restauration de l'intégrité des tissus agressés.

Jusqu'à récemment, il était admis que la fin de la réponse inflammatoire était un phénomène passif, lié à la seule diminution des médiateurs pro-inflammatoires. Il est maintenant reconnu que la résolution de l'inflammation est un processus actif qui débute dès la phase d'initiation de la réponse inflammatoire et implique plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires permettant de restaurer l'homéostasie et l'intégrité fonctionnelle tissulaire.

Lors de la phase de résolution, différents médiateurs endogènes sont produits qui activent la résolution de l'inflammation. Parmi ces médiateurs on retrouve une famille de médiateurs lipidiques dérivés d'acides gras polyinsaturés, en particulier les lipoxines et les résolvines dérivant de l'acide arachidonique (AA) et de l'acide docosahexaénoïque (DHA), respectivement. Ces médiateurs possèdent des activités anti-inflammatoires, anti-fibrotiques et anti-angiogéniques.

La non-résolution de l'inflammation est un processus critique dans la pathogenèse de nombreuses maladies inflammatoires chroniques, y compris dans les maladies touchant les voies respiratoires comme la broncho-pneumopathie chronique obstructive ou encore l'asthme.

La plupart des stratégies thérapeutiques anti-inflammatoires ciblent des médiateurs qui initient, amplifient et/ou entretiennent l'inflammation. Ainsi, la compréhension du rôle des médiateurs pro-résolvant pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques.

Notre objectif est de comprendre les mécanismes physiologiques de la résolution de l'inflammation des voies aériennes dans un modèle d'inflammation pulmonaire créé par administration intra-nasale de lipopolysaccharides (LPS) bactériens chez la souris.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, une approche *in vivo* dans un modèle murin est indispensable pour étudier la réponse inflammatoire des voies aériennes et sa phase de résolution et déterminer les stratégies thérapeutiques d'intérêt car aucun modèle moléculaire et/ou cellulaire n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre de reproduire l'ensemble des phénomènes biologiques impliqués dans la réponse inflammatoire et sa phase de résolution.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes, dans des cages enrichies de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, de la nourriture et de l'état des animaux. La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments pour visualiser tout signe de toxicité imprévue qui nécessiterait l'euthanasie de l'animal.

Réduire

La réalisation des procédures par un chercheur rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet une étude efficace de la réponse inflammatoire lors des modèles LPS antérieurs à l'aide de groupes de 6 à 8 souris. L'analyse statistique sera réalisée à l'aide d'un test de type ANOVA suivi d'une comparaison multiple par test de Tukey.

Nous envisageons donc l'utilisation d'un maximum de 600 souris sur une période de 3 ans.

10560 L'obésité est le cinquième facteur de risque mondial de mortalité et pose aujourd'hui un grave problème de santé publique. Beaucoup d'études sont consacrées à la compréhension des mécanismes à l'origine de l'obésité et montrent que des dérégulations au niveau du cerveau pourraient être responsables de ce syndrome. Des avancées récentes mettent en évidence que l'inflammation de certaines régions du cerveau, comme l'hypothalamus, entraînerait des troubles du comportement alimentaire. Plus spécifiquement, certains lipides contenus dans l'alimentation seraient responsables de cette inflammation et le degré d'inflammation hypothalamique induit par ces lipides serait dépendant de la qualité de leurs acides gras. Au niveau cellulaire, l'exposition à un excès de nutriments entraîne une activation des astrocytes et de la microglie (modifications génétiques et morphologiques) qui a un rôle préventif au départ mais peut devenir délétère sur le long terme et entraîner l'obésité. Chez le rongeur, des études récentes montrent que la prolifération de ces cellules s'observe dès les premières 24h de consommation de régime hyperlipidique, bien avant la mise en place de l'obésité. Dans ce projet, nous allons donc chercher à caractériser la réponse inflammatoire précoce (1h, 3h, et 6h) induite par différents types de régimes hyperlipidiques et définir si l'inhibition de cette activation pourrait prévenir l'apparition de l'obésité. Nous utiliserons 1164 animaux âgés de 8 semaines.

Ce projet se justifie pleinement d'un point de vue scientifique et obéit à la règle des 3R :

Remplacement : L'étude de l'obésité nécessite un système intégré affectant simultanément plusieurs tissus (foie, tissus adipeux, pancréas, muscles et cerveau). L'obésité n'est donc pas pour l'instant modélisable *in vitro*. Il est par conséquent impossible aujourd'hui de pouvoir réaliser notre étude sur la réponse inflammatoire autre que dans un contexte *in vivo* global. Le développement de l'obésité, et plus généralement la régulation du poids corporel, fait appel à plusieurs organes et processus intégrés. En fonction des données bibliographiques, notre étude doit donc nécessairement se faire sur l'animal entier.

Réduction : Le nombre de souris a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables (basé sur nos expériences et un calcul

statistique pour trouver un effet significatif). Pour évaluer le nombre d'animaux utilisés, nous avons utilisé le programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non. En cas de distribution normale, nous utiliserons des tests paramétriques (t-test pour comparer 2 échantillons, ANOVA pour comparer n échantillons). En cas de distribution non normale, nous utiliserons des tests non-paramétriques (tests de Mann-Whitney ou de Kruskal Wallis), même si ceux-ci sont moins sensibles.

Un nombre minimum d'animaux sera utilisé dans nos protocoles expérimentaux en respectant strictement ces différents points : (i) Utilisation d'un groupe de souris contrôles commun pour plusieurs séries d'études chaque fois que cela est possible. (ii) multi-prélèvements et création d'une base d'échantillons (cerveau et sang avant euthanasie).

Raffinement : Les animaux seront hébergés dans des cages sur portoirs, avec nourriture et boisson *ad libitum*. Avant expérimentation, les souris seront acclimatées pendant une à deux semaines durant lesquelles les expérimentateurs les habitueront à être manipulées. A partir du début de l'expérience, les animaux seront pesés 3 fois par semaine afin de suivre leur poids. Les expérimentateurs évalueront aussi l'état général des souris quotidiennement afin de déterminer la présence ou non de signes de stress ou de souffrance (attitude soumise, dos voûté, respiration difficile, extrémités pâles, démarche anormale, diarrhée, vocalises...). En cas de stress ou de souffrance, les animaux seront soignés selon la sévérité de la douleur observée et en cas où les signes de souffrance persisteraient, les animaux souffrants seront euthanasiés. Une fiche d'observation et une grille d'évaluation de l'état de nos souris ont été établies.

10561 Objectif scientifique du projet

Le mélanome malin cutané est la forme la plus agressive des cancers de la peau. Aujourd'hui, le seul traitement efficace reste la chirurgie pratiquée à un stade précoce car une fois disséminées, les cellules de mélanome deviennent résistantes aux chimiothérapies conventionnelles. Les espoirs apportés par l'essor des thérapies ciblées et immunothérapies ont été fortement nuancés par des cas de non-réponse ou rechutes rapides. Il est donc aujourd'hui crucial de comprendre les mécanismes de résistance mis en place par les cellules cancéreuses. En parallèle de l'acquisition de mutations génétiques, la plasticité des cellules cancéreuses apparaît comme un mécanisme candidat majeur. Nous avons déjà démontré le rôle oncogénique majeur d'un facteur de transcription clé de la plasticité au cours de la mélanomagenèse. Nous avons également montré que l'expression aberrante de ce gène est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de mélanome. Par ailleurs, nous avons clairement démontré l'implication de ce facteur dans la résistance aux thérapies ciblées. De plus en plus d'études, principalement sur des carcinomes, associent la plasticité cellulaire à l'échappement au système immunitaire. Cependant, aucune étude n'a encore démontré l'implication de notre facteur d'intérêt dans l'immuno-évasion des mélanomes et l'impact résultant sur la sensibilité aux immunothérapies. Les objectifs de ce projet sont donc d'étudier le rôle oncogénique de ce facteur dans des modèles murins de mélanome, les conséquences sur le système immunitaire et enfin d'évaluer son rôle dans la réponse aux immunothérapies.

Remplacement : Des expériences sur lignées cellulaires *in vitro* seront réalisées dans la mesure du possible, mais seul un modèle *in vivo* chez l'animal permettra d'étudier les interactions complexes entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires.

Réduction : Le nombre total de souris utilisées dans ce projet (n=1450) a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et reproductibles.

Raffinement : Un personnel qualifié s'assurera du bien-être des animaux. Une surveillance attentive des animaux 2 fois par semaine sera réalisée tout au long des procédures pour assurer la détection précoce des points limites. L'expérimentation ne sera pas poursuivie au-delà de l'apparition de signes évocateurs de mal-être ou de souffrance définis au préalable.

Nombre total d'animaux inclus dans ce projet : 1450

10562 Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde (31% de la mortalité globale). La dysfonction vasculaire largement reconnue comme un marqueur précoce du risque cardiovasculaire semble également participer au développement des maladies métaboliques comme l'obésité ou le diabète. De nombreuses études se sont intéressées à développer de nouvelles approches afin de déterminer la fonction vasculaire, en particulier au niveau de la microcirculation cutanée en raison de l'accès facilité chez l'homme et l'animal. De plus, des travaux précédents ont démontré que cette réactivité vasculaire cutanée était un bon reflet de la réactivité microcirculatoire des organes profonds.

Dans ce contexte, l'étude de la fonction vasculaire cutanée est réalisée grâce à des technologies basées notamment sur des signaux laser associées à une technique de diffusion transcutanée de molécules vasoactives par iontophorèse (courant de très faible intensité). Les drogues utilisées chez l'homme permettent d'explorer les capacités microvasculaires. Le Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) est la dernière technologie à disposition et présente une amélioration très significative de la résolution spatio-temporelle comme montrée dans des études chez l'homme. Cependant, aucune étude à notre connaissance n'a évalué la faisabilité de ces mesures de microcirculation cutanée en association avec la iontophorèse sur un modèle de souris avec le LSCI. Notre projet aura donc pour objectifs :

1. de valider l'utilisation du LSCI associé à la iontophorèse de drogues vasoactives (acétylcholine, nitroprussiate de sodium, phényléphrine, bradykinine, insuline classiquement utilisées chez l'homme) pour explorer la réactivité microvasculaire au niveau de la peau chez la souris saine anesthésiée

2. de comparer différents modes de stimulation iontophorétique (intensité/durée du courant faiblement ressenti par la souris et répétabilité des stimulations) pour permettre la meilleure diffusion de ces drogues vasoactives.

Dans ce but, 96 souris saines seront nécessaires afin de pouvoir mener à bien toutes les explorations microcirculatoires cutanées. 16 souris seront incluses dans chaque groupe, et chaque groupe permettra l'exploration d'une molécule vasoactive. Chaque molécule sera diffusée par iontophorèse par une application d'un courant. Lors de chaque iontophorèse, la mesure de la perfusion cutanée sera réalisée par la technique du LSCI.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 Rs :

Remplacement : A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant d'étudier la réactivité vasculaire microcirculatoire cutanée, nécessitant ainsi une approche intégrée. En effet, les modifications de la fonction vasculaire résultent d'un ensemble complexe d'interactions entre les différents tissus et impliquent des processus biologiques d'origine aussi bien systémiques que locales. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'homme.

Raffinement : Dans un souci de raffinement, il a été prévu d'utiliser un enrichissement de l'environnement sous forme d'igloos, de tubes, de coton pour permettre la création de nids et de bâtonnets en bois à ronger. Pendant toute la durée de l'étude, l'état de bien-être des animaux sera évalué au minimum 3 fois par semaine. L'observation de signe de douleur ou de mal être (prostration, état du pelage, perte de poids) entraînera la sortie du protocole de l'animal. Pour l'étude de la microcirculation cutanée nécessitant l'immobilisation des souris, une anesthésie à l'isoflurane sera privilégiée pour le confort de l'animal.

Réduction : Le nombre de souris nécessaire a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation des résultats.

10563 Dans la plupart des pays industrialisés, les maladies affectant le système digestif constituent des problèmes majeurs de santé publique. Le but de ce projet est d'améliorer la santé humaine en caractérisant le phénotype de souris génétiquement modifiées au niveau du locus d'une cadhérine atypique. L'analyse d'échantillons de patients et des expériences réalisées sur des lignées de

cellules intestinales indiquent que cette cadhérine atypique joue un rôle original et important dans l'intestin.

Le projet comporte 2 objectifs qui seront atteints en comparant des souris invalidées de façon homozygote pour le gène codant la cadhérine atypique à des souris contrôle de même portée. D'une part, il s'agira de définir le rôle de la cadhérine atypique dans le fonctionnement du système digestif. Pour cela, nous placerons les souris dans différentes conditions d'alimentation (régime normal, régime « high fat », régime enrichi en acides biliaires, régime normal après un jeûne) et réaliserons des analyses sanguines (mesure glycémie et lipémie), histologiques, transcriptomiques et fonctionnelles (perméabilité intestinale). D'autre part, il s'agira de déterminer l'implication de la cadhérine atypique dans les maladies intestinales (cancer du côlon, Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin). Ces maladies seront provoquées par croisement avec des souris développant spontanément des tumeurs bénignes intestinales (souris *Apc* Δ 14/+) ou par addition d'un agent pro-inflammatoire dans l'eau de boisson (DSS) et leur sévérité sera évaluée (ex. nombre et tailles des tumeurs, perte de poids, lésions histologiques).

Le projet a été conçu et sera mené dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Lorsque cela sera possible, nous utiliserons de préférence des lignées cellulaires et des organoïdes intestinaux, mais l'utilisation d'organismes entiers sera absolument nécessaire pour reproduire la complexité des interactions réciproques entre les différents organes du système digestif (intestin, foie, pancréas) et intégrer la physiologie de l'animal. Il n'existe à l'heure actuelle pas de modèles *ex vivo* / *in vitro* de remplacement à l'expérimentation animale pour atteindre les objectifs du projet.

- Raffinement : Les animaux seront élevés dans des conditions sanitaires et de bien-être optimales. Les procédures ont été réfléchies afin de limiter au minimum l'angoisse, la douleur et la souffrance des animaux. Un suivi régulier comprenant l'observation de critères spécifiques définis pour chaque protocole sera effectué pour détecter le plus précocement possible la douleur chez les animaux et y remédier.

- Réduction : Seules les expériences absolument indispensables au succès du projet seront mises en œuvre. Le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure a été défini sur la base de la littérature et de façon à permettre des analyses statistiques (test de Student, test de Wilcoxon-Mann-Whitney). Au maximum, la réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 458 souris.

10564 La sénescence cellulaire, ou vieillissement cellulaire, est un processus participant au vieillissement des organismes et aux pathologies associées, dont le cancer. La transformation d'une cellule normale en cellule tumorale peut se faire avec ou sans passage par un état sénescents, en fonction de l'ordre des événements modifiant le comportement cellulaire et aboutissant à la formation de cellules tumorales. Les cellules tumorales qui passeraient par un état sénescents, obtiendraient des propriétés particulières aboutissant à des tumeurs plus dangereuses. Pour confirmer cette hypothèse un modèle cellulaire dans lequel les cellules tumorales passeront ou non par un état de sénescence sera alors développé, puis greffé dans un modèle murin pour caractériser les différences en terme de prise tumorale, d'agressivité et de réponse aux traitements de type chimiothérapeutique. Ce travail devrait permettre de montrer les conséquences de la sénescence cellulaire sur certaines propriétés des tumeurs et ainsi, au-delà d'une amélioration de la compréhension des mécanismes, pourrait renforcer l'intérêt d'éliminer les cellules sénescents pour prévenir la formation de certaines tumeurs lors du vieillissement.

Ce protocole induira l'utilisation au maximum de 280 souris.

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

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

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

10565 L'expansion des hémisphères cérébraux (néocortex) est la clé de voute de l'évolution des fonctions cognitives chez les mammifères. De nombreuses pathologies peuvent affecter ce développement optimum. Parmi celles-ci, les microcéphalies affectent 2-3% de la population mondiale et découlent souvent de l'exposition de l'embryon à des conditions de grossesse défavorables. Il existe cependant des formes congénitales (MCPH) extrêmement rares mais qui représentent des outils de choix pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents. Les patients MCPH sont porteurs de mutations dans l'un des 12 gènes (MCPH1-12) responsables de la maladie et présentent principalement une petite tête et un déficit intellectuel. Ces pathologies sont désormais diagnostiquées de plus en plus tôt, mais il n'existe à ce jour aucune approche thérapeutique. En utilisant les souris déficientes en neuropeptide VIP (peptide vasoactif intestinal) qui ont un cerveau de petite taille et peu de protéines MCPH1, nous avons l'occasion unique d'étudier les interactions étroites entre les facteurs environnementaux extrinsèques et la production maternelle de VIP pendant la période cruciale du développement des fonctions corticales. Cette approche devrait permettre de déterminer de façon précise l'incidence respective de différents stress sur la formation du cerveau. Les résultats de cette étude devraient permettre de 1-améliorer notre compréhension des facteurs responsables de l'apparition de microcéphalie et des déficits intellectuels et ainsi 2-proposer des stratégies de protection. Ce projet utilisera un maximum de 2000 femelles et 5000 descendants de tout sexe sur 5 ans. Le nombre de souris a été calculé au plus juste selon la règle des 3Rs. Ainsi les animaux témoins seront utilisés dans plusieurs séries d'expériences pour en limiter le nombre. Le projet repose essentiellement sur l'utilisation de souris femelles dans des accouplements datés (constatés par la méthode indolore du bouchon vaginal) pour générer des embryons, des fœtus et de jeunes souriceaux et étudier la croissance de leurs cerveaux et leurs capacités intellectuelles. Par ailleurs l'ordre des expériences a été affiné et les cages de reproduction seront gérées avec soin pour ne collecter que les échantillons nécessaires à la constitution des groupes expérimentaux sans générer des reproductions inutiles. Les zootechniciens ont toute autorité pour faire cesser l'expérimentation sur un animal donné selon les critères déterminés (points limites). Enfin certains résultats *in vivo* (obtenus sur les stades embryonnaires précoces) seront confirmés à partir de culture de cellules souches neurales réalisées en routine au laboratoire afin de remplacer au maximum les expériences *in vivo* par des tests *in vitro*.

10566 Le cannabis est une des drogues la plus utilisée dans le monde (166 millions d'utilisateurs dont 15 millions de personnes dépendantes). Les cannabinoïdes, dont le Δ^9 tétrahydrocannabinol (THC) est le principe actif du cannabis, sont responsables des effets toxiques et addictifs du cannabis. Ces effets mettent en jeu principalement les récepteurs aux cannabinoïdes de type 1 (CB1). Une sur-activation des récepteurs CB1 a des impacts neurologiques importants et peut être ainsi impliquée dans de nombreux désordres psychiatriques et comportementaux liés à l'abus de cannabis.

Découvrir une thérapie pouvant atténuer ces effets toxiques est un enjeu de santé publique. Nos travaux de recherche récents ont démontré chez le rongeur qu'un stéroïde, la pregnénolone, était produit dans le cerveau à la suite d'une sur-activation CB1 et pouvait en retour diminuer certains effets centraux des cannabinoïdes. Notre projet de recherches consiste maintenant à mieux appréhender les interactions entre cannabinoïdes et pregnénolone dans un but de développement thérapeutique.

Notre stratégie a été de développer une banque de composés synthétiques innovants, dérivés de la pregnénolone n'étant pas métabolisables en d'autres stéroïdes et permettant de moduler certaines conséquences de la sur-activation des récepteurs CB1.

Nous avons démontré qu'un de ces composés est doté d'un excellent index thérapeutique pour l'addiction au cannabis et il a obtenu l'autorisation d'administration chez l'homme.

Cependant, il reste à mettre en évidence quels mécanismes moléculaires et cellulaires sont impliqués dans les effets comportementaux de la pregnénolone et de ses dérivés.

6 composés, issus de la même famille et sélectionnés sur la base d'études *in vitro*, seront tout d'abord testés chez des souris recevant différentes doses de THC. Après avoir testé leur efficacité fonctionnelle (études comportementales), nous analyserons les mécanismes moléculaires impliqués au niveau des voies de signalisation des récepteurs CB1.

Sur la base de ces résultats deux composés seront sélectionnés et leur potentiel thérapeutique sera étudié chez la souris à la suite d'administration en chronique.

Enfin, nous testerons l'efficacité de ces 2 composés à atténuer les effets de nouveaux cannabinoïdes synthétiques, qui agissent sur CB1, et qui sont nouvellement disponibles sur le marché et utilisés chez l'homme.

L'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation de 6468 souris sur 3 ans. Ce projet se fera dans le respect des règles des 3R. Des approches substitutives ont été réalisées en amont pour sélectionner *in vitro* les composés sur leur potentiel thérapeutique ; ce qui permettra d'utiliser moins d'animaux. Pour ce projet préclinique il n'existe actuellement pas de méthode alternative ou substitutive à l'utilisation d'animaux, qui est un prérequis pour de futures études cliniques éventuelles chez l'homme. En effet, l'approche *in vitro* ne permet pas d'étudier l'effet de futurs médicaments sur l'individu dans son ensemble. Les études de ce projet permettront l'évaluation chez l'animal 1) du devenir, 2) de la tolérance et 3) du potentiel thérapeutique des molécules testées dans le but de développement chez l'homme. Elles permettront ainsi d'anticiper les doses optimales qui devront être testées chez l'homme. De plus, seule l'approche *in vivo* permet d'analyser les mécanismes impliqués dans les effets comportementaux en mettant en relation pour chaque animal les analyses faites *ex vivo* (sur des tissus et organes) et le comportement observé.

Afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment, dans un souci de respect du R de réduire, nous utiliserons 10 animaux par groupe, ce qui permettra de pouvoir faire des analyses statistiques cohérentes et le maximum sera fait pour utiliser les mêmes animaux dans plusieurs protocoles expérimentaux. Aussi, dans le respect du R de raffiner, les procédures expérimentales utilisées seront peu invasives (et donc ne nécessiteront pas l'utilisation d'anesthésiques ou d'antalgiques). Il y aura une observation accrue des animaux surtout dans les protocoles avec un traitement chronique et si nécessaire, une modification du protocole adaptée à l'état de l'animal sera mise en place. Par exemple, des traitements appropriés (anti-inflammatoire, antidouleur) seront utilisés selon l'avis du vétérinaire.

10567 La flore intestinale appelée aussi microbiote, est constituée chez l'Homme, entre autres, de plus de 1000 espèces bactériennes différentes qui représentent entre 1 et 2 kg. Cette abondance oblige l'organisme à mettre en place des systèmes de défense. Parmi ceux-ci, on trouve les peptides antimicrobiens. Ce sont de petites molécules secrétées par les cellules intestinales qui possèdent une charge électrique positive. Les bactéries, quant à elles, arborent une charge de surface globalement négative. Les charges négatives et positives s'attirant, lorsqu'un peptide antimicrobien « rencontre » une bactérie, il s'y fixe, créant des pores dans la paroi bactérienne, tuant ainsi la bactérie.

Il a été remarqué que certaines espèces bactériennes du microbiote intestinal possèdent des gènes qui coderaient pour des protéines capables de modifier la charge électrique de surface. Nous avons identifié plusieurs gènes candidats et vérifié *in vitro* qu'ils étaient impliqués dans la résistance aux peptides antimicrobiens secrétés par le tractus digestif. Notre hypothèse est que cette modification de la charge et la résistance accrue aux peptides antimicrobiens qui en découle, permettraient aux bactéries l'accès à de nouvelles niches écologiques favorisant ainsi leur implantation digestive.

Afin de tester cette hypothèse, les gènes candidats ont été clonés dans une souche de *Escherichia coli* non pathogène déjà rapportée comme colonisant très mal le tractus digestif de la souris. Des souris seront gavées avec l'*E. coli* possédant ou non un gène modifiant la charge de surface. Nous testerons la capacité de ces souches à coloniser le tractus digestif en suivant notamment le nombre

de ces bactéries dans les fèces des animaux. Nous regarderons aussi si cela est corrélé avec une modification dans la composition du microbiote.

Sur la durée du protocole, nous utiliserons 100 souris (10 lots de 10 animaux). Chaque lot recevra par un gavage unique la souche d'E. coli possédant ou non un des gènes modifiant la charge de surface. Aucune méthode alternative n'existe car nous désirons étudier la capacité des souches bactériennes possédant les gènes candidats à coloniser le tractus digestif ainsi que l'impact sur la composition du microbiote intestinal. Des études menées en amont *in vitro*, ont permis de cribler des gènes candidats de manière à réduire le nombre de souris utilisées. Les animaux seront hébergés dans des cages standards avec un accès illimité à l'eau et à la nourriture et le milieu sera enrichi à l'aide de maisons en carton. La souche bactérienne utilisée n'est pas rapportée comme néfaste pour les souris et les gènes candidats testés sont retrouvés dans les bactéries du microbiote intestinal normal. Cependant, un suivi quotidien des animaux sera effectué de manière à repérer toute détresse animale. Si besoin, les animaux seront traités avec un anti-inflammatoire non stéroïdien, le paracétamol, qui sera administré par gavage. Le poids des souris sera également suivi avec attention (pesées deux fois par semaine) car il reflète bien l'inflammation intestinale et la sévérité d'une diarrhée. Une perte de plus de 10% du poids initial constituera un critère d'arrêt et l'animal en question sera euthanasié. Les expériences se dérouleront dans une salle de l'animalerie dédiée aux infections.

10568 La sclérodémie systémique (Ssc) est une maladie auto-immune caractérisée par une fibrose de la peau, des poumons et autres organes. CD146 est une molécule d'adhérence essentiellement localisée dans le système vasculaire, et également présente sous forme soluble (CD146s). Récemment, le rôle de CD146/CD146s a été mis en évidence dans l'activité fibrosante de la sclérodémie. La forme soluble détectable dans le sang des patients, CD146s, est significativement plus élevée dans la population sclérodémique en comparaison au groupe témoin, et sa diminution chez les patients est associée de façon significative à l'aggravation de la fibrose. L'étude de l'impact du CD146 sur des modèles murins de fibrose cutanée induite à la bléomycine montre une fibrose significativement supérieure chez les souris CD146KO par rapport aux souris saines. Enfin chez ces souris, l'injection de CD146s diminue significativement la fibrose. Ces résultats montrent donc le rôle clé de CD146 dans le processus de fibrose dans la sclérodémie systémique, ainsi que le rôle potentiellement protecteur de CD146s dans l'évolution fibrosante. De plus nous montrons que CD146 participe à la fibrose de type sclérodémie systémique via la voie Wnt. Wnt est une famille de glycoprotéines riches en cystéines d'environ 350 acides aminés sécrétées dans le milieu extracellulaire, jouant un rôle important chez tous les animaux dans l'embryogenèse et l'homéostasie des tissus adultes (de ce fait son dérèglement peut conduire à des cancers). Le but de notre projet est de confirmer le rôle de CD146/CD146s dans la fibrose, que celle-ci soit cutanée mais aussi pulmonaire ou sur un autre organe, et d'étudier l'effet de la forme soluble afin de définir le système CD146/CD146s comme cible diagnostic et/ou thérapeutique. D'autres molécules potentiellement anti-fibrosantes pourront être testées en parallèle.

La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés. Ainsi ce projet utilisera 200 souris.

Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'étude des processus ischémiques n'est pas possible en culture cellulaire. La culture ne permet pas d'analyser les interactions cellules-cellules telles qu'elles sont situées dans le tissu. De plus, en culture, les cellules ne sont pas sujettes au débit et à la pression du sang non plus qu'aux nombreux autres facteurs et signaux qui sont le propre d'un organisme entier et vivant. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés (transgéniques et knockouts) représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les processus biologiques.

Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant le raffinement de l'environnement. Les élevages sont effectués au

sein de notre établissement agréé et des personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et le bien-être des animaux sont contrôlés.

Les animaux seront hébergés dans des cages ventilées par air filtré, avec enrichissements à types de copeaux, nids et tunnels, avec alimentation et eau *ad libitum*, dans des locaux Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS) agréés par le Ministère de l'Agriculture, dont la température et l'hygrométrie sont continuellement surveillés par télémétrie (3R : Raffinement).

Tout au long de l'expérimentation nous nous attacherons à reconnaître la douleur, la quantifier via une échelle, agir lorsque les critères d'interruption prédéfinis sont atteints, noter dans le registre des animaux les observations faites et les actions entreprises. Ainsi l'ensemble de ces arguments démontre la faisabilité de notre projet.

Le protocole sera arrêté si l'animal présente un mauvais état de santé.

10569 La vaccination est une des plus grandes avancées médicales de tous les temps. Elle a permis de réduire l'incidence de nombreuses maladies infectieuses humaines ou animales, voire parfois d'en éradiquer.

La vaccination repose sur la stimulation préventive du système immunitaire de l'individu à protéger. En lui administrant un agent infectieux tué ou moins virulent, ou l'un de ses constituants, on déclenche une réponse immunitaire qui gardera cette rencontre en mémoire. Lorsque l'individu rencontrera l'agent infectieux, il déclenchera une réponse immunitaire rapide et intense.

Cependant, tous les vaccins ne sont pas aussi efficaces pour induire une réponse protectrice. Pour un même agent infectieux, ces différences peuvent dépendre en particulier de la nature du vaccin (agent tué ou atténué), de la nature de l'adjuvant et de la voie d'administration. Par ailleurs, pour un même vaccin, certains individus sont "bons répondeurs" et d'autres "mauvais répondeurs". Par exemple, le vaccin saisonnier contre la grippe induit une réponse protectrice chez environ la moitié des individus vaccinés, avec des variations entre les différents types et sous-types viraux qui composent le vaccin. Le but de ce projet est d'étudier les facteurs génétiques de l'individu qui modulent sa réponse à la vaccination. De telles études peuvent être réalisées chez l'homme mais elles requièrent de recruter de grandes cohortes pour tenir compte des nombreux facteurs non génétiques qui peuvent influencer la réponse vaccinale (âge, sexe, passé infectieux, état immunitaire, nutrition, etc...) et il est difficile d'assurer le suivi de ces cohortes dans le temps.

Dans ce projet, nous étudierons la réponse vaccinale de lignées de souris présentant une grande diversité génétique. La grande proximité des systèmes immunitaires humain et murin justifie d'avoir recours à cette espèce animale. En comparant la réponse vaccinale de ces lignées avec leur composition génétique, nous pourrions identifier des facteurs génétiques qui contrôlent cette réponse.

La réponse immunitaire à un vaccin résulte de phénomènes complexes qui mettent en jeu plusieurs types cellulaires, dans différents tissus et organes. Cette réponse ne peut pas être modélisée dans des systèmes *in vitro* et ne peut être étudiée que dans un organisme entier. Le nombre d'animaux utilisés, initialement établi à 5 souris par lignée, par sexe et par vaccin d'après un calcul de puissance statistique, sera ajusté en fonction des premiers résultats et l'étude portera sur les deux sexes. Les conditions de vaccination seront standardisées pour maximiser la puissance des expériences. Sur les 5 ans du projet, nous prévoyons d'utiliser au maximum 800 souris dans une procédure de sévérité légère. La procédure consistera à injecter par voie intramusculaire un vaccin à plusieurs reprises (primovaccination et rappels éventuels) et à effectuer des prélèvements sanguins pour suivre la réponse en anticorps. Nous n'anticipons aucune réaction, locale ou générale, à l'injection des vaccins qui sont utilisés en médecine humaine. Les inoculations et les prélèvements seront réalisés par des personnes compétentes et bien entraînées pour engendrer un minimum d'inconfort pour les animaux.

Ce projet nous permettra de caractériser l'influence de facteurs génétiques sur la réponse à différents vaccins. Il permettra d'identifier des mécanismes qui pourront être utilisés pour l'amélioration de l'efficacité des vaccins.

10570 Le Cancer du Poumon Non à Petites Cellules (CPNPC) est la principale cause de décès par cancer dans le monde. La majorité des patients sont diagnostiqués à un stade avancé de la maladie et sont traités par chimio/radiothérapie. Ces traitements sont de plus en plus souvent associés à des thérapies ciblées. Toutefois, en dépit des traitements, la survie à cinq ans n'est que de 15%, principalement due aux métastases. Les traitements immunomodulateurs ont montré leur efficacité dans cette pathologie. Pourtant ils sont inefficaces pour une proportion importante des patients.

La plupart des études en immunologie anti-tumorale chez l'animal ont utilisé des modèles de tumeurs transplantées. Ces modèles reposent généralement sur l'injection sous-cutanée d'un grand nombre de cellules tumorales. Cependant, ce procédé résulte en une croissance tumorale très rapide, qui ne représente pas le développement progressif des tumeurs observées chez les patients. Ces modèles ne sont donc pas adaptés pour étudier les interactions entre les cellules tumorales et le système immunitaire. Au contraire, les modèles murins induits génétiquement récapitulent le déroulement de la maladie telle qu'elle est observée chez les patients atteints de cancers. Le développement de la tumeur dans ces modèles repose sur des altérations génétiques déjà observées chez l'homme. Ces altérations génétiques surviennent sur un nombre limité de cellules normales à partir desquelles la tumeur se développe au sein de son microenvironnement d'origine.

Les études sur l'immunité anti-tumorale portent habituellement sur la réponse T CD8. La réponse T CD4 est beaucoup moins décrite et pourtant les effecteurs T CD4 peuvent avoir une activité positive ou négative vis à vis des tumeurs. En outre la stimulation des LT CD4 comme arme thérapeutique anti-tumorale est intéressante car les mécanismes de résistances de la tumeur sont différents pour les CD8 et les CD4.

Dans ce projet nous souhaitons comprendre comment des lymphocytes CD4 ou CD8 réagissent vis à vis d'un antigène (Ag) exclusivement exprimé par la tumeur, en utilisant un modèle de tumeurs pulmonaires induit génétiquement.

Nombre d'animaux pour ce projet : 1373 souris.

Remplacer : Ni les modélisations mathématiques, ni les systèmes *in vitro* ne permettent d'étudier les interactions entre le système immunitaire et les Ags tumoraux. En effet le système immunitaire est un système très compartimenté entre les organes lymphoïdes et les tissus avec une régulation des flux de cellules très précise entre ces différents compartiments.

Réduire : les résultats attendus à l'issue de ce projet n'ont pas été publiés à ce jour dans la littérature scientifique. Nous pratiquerons le minimum d'expériences permettant à la fois d'être certain de la reproductibilité des phénomènes observés en assurant la puissance statistique nécessaire en tenant compte de la variabilité expérimentale du modèle employé.

Raffiner : Les souris seront anesthésiées pour l'induction des tumeurs et pour l'imagerie. Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et pour monitorer les éventuels signes de douleur, de souffrance ou de stress. Des points-limites ont été établis.

10571 L'insuffisance rénale chronique (IRC) est une maladie multifactorielle souvent associée à l'hypertension artérielle et au diabète. Si elle n'est pas correctement traitée, l'IRC conduit à la mise en place d'une hémodialyse. De plus, les patients IRC présentent un fort risque de développer des maladies cardiovasculaires. Beaucoup d'entre eux meurent avant même la mise sous dialyse. Parmi les atteintes cardiovasculaires observées chez les patients IRC, la calcification des vaisseaux (trait caractéristique de l'athérosclérose tardive) est très fréquente. Notre projet vise à étudier les mécanismes physiopathologiques reliant l'IRC et la calcification vasculaire et tenter d'identifier des cibles moléculaires de potentiels candidats médicaments contre les maladies cardiovasculaires. Les mécanismes étudiés mettent en jeu l'interaction croisée de plusieurs organes qu'il est impossible de reproduire *in vitro*, ce qui implique de mener des études sur des modèles précliniques animaux. L'IRC sera induite par ablation partielle rénale (néphrectomie) chez des souris normales et chez des souris enclines à développer de la calcification vasculaire : les souris ApoE^{-/-}. Nous utiliserons également un modèle de développement rapide (quelques jours) de calcification vasculaire indépendant de l'IRC et consistant en une surcharge en Vitamine D3. Après

caractérisation des modèles, les souris seront exposées à des traitements pharmacologiques ou moléculaires susceptibles de bloquer la calcification. Avant leur euthanasie, les animaux seront soumis à des investigations *in vivo* pour évaluer la fonction rénale (diurèse, débit de filtration glomérulaire) et cardiaque (échographie). La calcification vasculaire sera mesurée sur des vaisseaux (aorte) prélevés après euthanasie.

Ce projet prévoit l'utilisation de 1092 animaux. Les expériences seront organisées de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux en prenant en compte la mortalité liée à la néphrectomie (environ 20% ?). Suite à la chirurgie, une injection de buprénorphine est pratiquée pour limiter la douleur au réveil. Compte tenu des potentiels effets indésirables de certaines procédures sur l'état de santé global des animaux, les expériences font l'objet d'un suivi attentif et précis de leur bien-être et de la douleur selon les exigences de la règle des 3R.

10572 La myopathie myotubulaire est une maladie congénitale très sévère des muscles squelettiques. Cette pathologie affecte 1 garçon sur 50 000, n'a aucun traitement et conduit dans la majorité des cas au décès prématuré du patient. Elle est due à des mutations dans le gène *Mtm1* qui code pour la myotubularine, une protéine essentielle pour les membranes du muscle. Dans la pathologie, l'absence de myotubularine entraîne une désorganisation et une faiblesse musculaire, qui affecte aussi les muscles respiratoires. Dans les derniers stades de la maladie, les patients ont besoin d'un soutien ventilatoire.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour faire des preuves de concept thérapeutiques, car les modèles cellulaires de la maladie ne permettent pas d'étudier les défauts liés à la fonction du muscle (perte de force non mesurable sur des modèles cellulaires, pas de remplacement possible). A l'opposé, les modèles animaux permettent de mesurer la force musculaire et de tester l'effet des traitements sur l'ensemble des tissus. Ils reproduisent généralement les pathologies musculaires avec fidélité.

Il existe un modèle de souris reproduisant les symptômes principaux de la maladie humaine. Cependant, certains symptômes de la maladie humaine, tels que les problèmes hépatiques et rénaux, ne sont pas retrouvés dans le modèle murin. De plus, la pathologie est rapidement progressive chez la souris, alors qu'elle apparaît dès la naissance chez l'homme. Enfin, le métabolisme des souris présente des différences significatives par rapport à l'espèce humaine, ce qui pourrait biaiser le test de médicaments dans cette espèce. Pour toutes ces raisons, notre projet vise à créer et caractériser un nouveau modèle animal de myopathie myotubulaire en introduisant chez le rat une mutation inactivant le gène *Mtm1*. Cette espèce a été choisie car elle permet une meilleure reproduction des symptômes cliniques humains dans les maladies musculaires.

Si les rats reproduisent bien la pathologie humaine, ils présenteront un défaut de motricité. Afin de raffiner nos études, un aliment hydratant et nourrissant sera placé au sol dans la cage afin de faciliter l'accès aux rats malades. Les animaux seront observés attentivement trois fois par semaine (minimum) et euthanasiés si les points limites sont atteints.

Pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans cette étude, les mêmes rats seront utilisés pour les tests moléculaires et les tests fonctionnels. Le nombre de rats nécessaire a été estimé à 10 rats par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes). Les rats seront élevés et reproduits dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 1,5 ans et nécessitera l'utilisation totale de 130 rats.

10573 Si l'obésité est un réel problème de santé publique, générant une diminution de l'espérance de vie en raison des maladies qu'elle entraîne (hypertension, cancers, diabète ...), elle est également associée des déficits de mémoire. C'est d'autant plus problématique pendant l'enfance et l'adolescence qui représentent des périodes de maturation de certaines structures du cerveau indispensables pour la mémoire, comme l'hippocampe. Notre équipe a récemment mis en évidence chez la souris que la consommation d'une nourriture hyperlipidique (HL) pendant l'adolescence, en plus d'entraîner l'obésité, perturbe la mémoire et ceci implique certaines molécules, les endocannabinoïdes, au sein de l'hippocampe. L'objectif du présent projet est de mieux comprendre le rôle des endocannabinoïdes de l'hippocampe dans les perturbations de la mémoire induites par

la consommation d'une nourriture HL pendant l'adolescence chez la souris. Pour cela des souris seront exposées pendant 12 semaines à une nourriture HL ou standard avant de réaliser des tests comportementaux simples permettant d'évaluer la mémoire.

En plus de l'hippocampe, les endocannabinoïdes peuvent agir sur une autre structure cérébrale pour moduler la mémoire, l'amygdale. Nous comparerons donc les effets de manipulation des récepteurs aux endocannabinoïdes dans chacune de ces structures sur la mémoire évaluée lors de tests comportementaux (lot 1a) et sur la plasticité cérébrale (lot 1b). Dans le cerveau, les endocannabinoïdes peuvent agir sur différentes cellules (neurones ou cellules gliales). Nous évaluerons donc les effets de la manipulation des récepteurs aux endocannabinoïdes spécifiquement sur certaines cellules de l'hippocampe sur la mémoire (lot 2a) et sur la plasticité cérébrale (lot 2b). Au sein de chaque cellule, les endocannabinoïdes peuvent agir sur différents compartiments de la cellule. En ciblant le type cellulaire identifié grâce au lot 2, nous évaluerons au niveau de l'hippocampe les effets de la manipulation spécifique des récepteurs aux endocannabinoïdes dans différents compartiments cellulaires sur la mémoire (lot 3a) et sur la plasticité cérébrale (lot 3b). Dans l'hippocampe, les endocannabinoïdes changent la libération de neurotransmetteurs. En ciblant le type cellulaire identifié grâce au lot 2, nous évaluerons les effets de l'activation (lot 4a) ou de l'inhibition (lot 4b) de ces cellules sur la mémoire. De plus, rapidement après les tests de mémoire les souris seront anesthésiées, euthanasiées et l'hippocampe sera prélevé dans le but de vérifier les effets de nos interventions (lots 1-4).

L'étude intégrée des effets de la nutrition sur des aspects comportementaux et de fonctionnement cérébral est permise grâce à l'utilisation du modèle de rongeur soumis à de la nourriture obésogène et il n'est pas possible de le remplacer par des approches cellulaires. Les tests comportementaux utilisés font appels à des comportements innés chez les rongeurs. Les souris seront hébergées tout au long de leur vie en cage collective avec un environnement enrichi dans une animalerie agréée comportant une régulation de la température, de l'hygrométrie et du cycle jour/nuit. Elles recevront de l'eau et de la nourriture à volonté, elles seront changées régulièrement et elles seront observées tous les jours de la semaine et pesées 1 fois par semaine par un personnel qualifié. Au cours de ces observations, si un animal présente des blessures, il sera immédiatement soigné et surveillé deux fois par jour. Si un animal présente un comportement anormal traduisant un état de mal être (perte de poids, poils hérissés, prostration...), il sera immédiatement isolé et surveillé. Si l'animal ne montre pas d'amélioration significative, il sera euthanasié dans les 48h. Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale avec administration d'antalgiques en pré- et post-opératoire pour limiter la douleur. En minimisant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et permettre des comparaisons statistiques fiables, nous estimons que 13 souris par groupe seront nécessaires pour mener à bien le projet. Cela représente un total de 1092 souris sur 4 ans. Ces expériences devraient permettre une meilleure compréhension des effets d'une nourriture HL sur le cerveau et la mémoire en identifiant certains mécanismes afin d'envisager potentiellement à plus long terme des stratégies thérapeutiques.

10574 Le circovirus porcin de type 2 (PCV2) est l'agent viral responsable de la maladie d'amaigrissement du porcelet affectant les porcelets en post-sevrage. L'infection par le PCV2 a de lourdes conséquences économiques en production porcine. Il est présent dans la majorité des élevages sans symptôme associé, et peut donc être retrouvé dans des proportions plus ou moins importantes dans le plasma des porcs adultes. Or, ce plasma est utilisé ponctuellement comme additif alimentaire juste après le sevrage pour apporter des anticorps qui peuvent renforcer l'immunité des porcelets. Dans ce cas il faut s'assurer que ce plasma ne contient pas de pathogène porcin nocif pour les animaux de cet âge car au moment du post-sevrage, le système immunitaire des porcelets est immature et ne pourra pas contrôler ce pathogène. L'objectif du projet est de produire du plasma de porc fortement chargé en PCV2, pour valider *in vivo* des techniques de stérilisation du plasma actuellement en cours d'évaluation *in vitro*.

Pour obtenir la quantité de plasma suffisante pour réaliser un essai à venir, nous allons inoculer du PCV2 à 15 porcelets et prélever le plasma après euthanasie des animaux lorsque le pic de virémie

sera atteint. L'infection PCV2 expérimentale avec la souche utilisée ici est quasiment asymptomatique (hormis une légère hyperthermie transitoire).

Notre procédure expérimentale sera menée dans le respect de la règle des 3R : réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique (nombre total utilisé : 15 porcs), mesures de raffinement qui viseront à assurer des conditions d'hébergement limitant l'angoisse potentielle des animaux (eau et nourriture à volonté, enrichissements par des jouets...). De plus, les animaux seront observés quotidiennement. Si toutefois, l'infection conduisait à une altération de l'état de santé, les animaux concernés seront euthanasiés en cas d'atteinte des points limites. En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable car il n'existe pas de méthode à base de culture cellulaire permettant de produire du PCV2 dans des quantités aussi fortes que celles retrouvés dans les plasmas de porc.

10575 L'épizootie d'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) qui a eu lieu en France durant l'hiver 2016-2017 a impacté très durement la filière palmipède à foie gras mais également l'ensemble des filières avicoles françaises (mortalité, abattages préventifs). Cette épizootie était causée par des virus grippaux très majoritairement de sous-type H5N8. Elle a démontré les limites des mesures préventives, de contrôle et de lutte, pour endiguer la diffusion de la maladie dans le contexte actuel de l'élevage en France. Les élevages de canards pour la production de foie gras ont joué un rôle prépondérant dans cette épizootie (80% des foyers étaient des élevages de canards PAG). Parmi ceux-ci circulent toujours actuellement des virus IA faiblement pathogènes (IAFP) de sous-type H5. Cette étude porte sur la dynamique de transmission de la maladie au sein d'un lot de canards « prêts à gaver » (PAG) de l'espèce mulard (espèce utilisée très majoritairement dans cette filière). Pour cela, une procédure expérimentale mettant en contact des canards inoculés avec des canards naïfs dans un même parc (i.e. contact direct) et avec d'autres canards naïfs placés dans un autre parc (contact par voie aérienne seulement, i.e. contact indirect) sera conduite. Cette procédure sera réalisée dans quatre essais distincts, variant sur les sous-types et les âges des canards, soit un effectif total de 87 canards. Ces essais ont été conçus pour maximiser les résultats en minimisant le nombre d'animaux. Ces essais permettront 1) de décrire la transmission directe et indirecte pour une souche IAHP représentative de l'épizootie française de l'hiver 2016-2017 et pour une souche IAFP représentative des virus circulant actuellement en France dans la filière canard gras, 2) de comparer la transmission de la souche IAHP entre des canards en début et fin de la phase d'élevage PAG, et 3) de comparer la transmission entre des canards naïfs vis-à-vis de l'IA et des canards ayant été infectés auparavant par la souche IAFP. Pour chaque répétition de la procédure, l'évolution de l'excrétion virale, de l'expression clinique et de la réponse immunitaire sera suivie durant 21 jours par un suivi clinique, des écouvillonnages oro-pharyngés et cloacaux, des prises de sang et des prélèvements de plumes sur les sujets et par des prélèvements d'air. Un point limite à mettre en œuvre sur la base de l'observation clinique a été défini pour limiter à son minimum la douleur des sujets infectés.

Aucune méthode alternative à l'expérimentation animale n'est disponible pour évaluer ces paramètres pour un couple souche IA/espèce de volaille lorsque l'infection n'est pas systématiquement symptomatique, le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire.

10576 La myopathie de Duchenne est une maladie génétique dans laquelle une protéine, la dystrophine, est absente. Cette maladie, liée au chromosome X, touche le muscle chez les jeunes garçons, provoquant une faiblesse musculaire généralisée et évolutive. Si la maladie est bien décrite et connue chez ces enfants malades, quelques études récentes montrent qu'un phénotype, notamment de fibrose myocardique, pourrait exister chez leurs mères, pourtant considérées comme porteuses saines de la maladie. Un dépistage de cette fibrose, par exemple par IRM cardiaque, pourrait être proposé pour ces femmes, mais aucune étude approfondie sur cohortes n'a été effectuée pour en étudier la pertinence, seuls des cas isolés de découvertes fortuites ont été rapportés.

Il existe différents modèles de myopathie de Duchenne pour travailler sur l'élaboration de médicaments pour traiter les enfants atteints, depuis les modèles *in vitro* (myoblastes, myotubes.) jusqu'aux modèles animaux. Toutefois, seul le contexte du chien atteint spontanément par cette maladie, le chien GRMD (golden retriever muscular dystrophy), reproduit de manière fidèle les manifestations cliniques et fonctionnelles rencontrées chez les patients. Les mères de ces chiens malades sont, comme chez l'Homme, considérées comme porteuses saines. Toutefois, les rares chiennes porteuses que nous avons déjà pu examiner semblent montrer une fibrose myocardique précoce, et pourraient, de ce fait, aider à comprendre l'évolution de cette fibrose chez les mères d'enfants atteints, à améliorer leur prise en charge, et à proposer des thérapies permettant de ralentir l'évolution de cette fibrose et de la cardiomyopathie qui pourrait en découler.

Le projet pour lequel cette autorisation est demandée a tout d'abord pour objectif de confirmer qu'une fibrose myocardique est bien présente chez ces chiennes porteuses et de valider l'IRM cardiaque comme outil de quantification non invasif de cette fibrose. Secondairement, cette étude servira de base pour déterminer l'intérêt et la variabilité de ce modèle potentiel de fibrose myocardique, permettant par la suite des calculs de puissance pour d'éventuelles études ultérieures qui pourront donc être conçues à partir d'un nombre optimisé d'animaux. Si ces femelles porteuses s'avèrent être un modèle intéressant de fibrose myocardique, il pourrait même être envisagé de les utiliser à la place de chiens GRMD pour tester des thérapies ciblant la cardiomyopathie de Duchenne.

Aucune étude statistique n'est prévue à ce stade, cette étude étant descriptive, et destinée à produire une base de données sur lesquelles s'appuyer pour pouvoir faire des calculs de puissance nécessaires à l'élaboration de protocoles expérimentaux (calcul de n) si ces femelles étaient utilisées comme modèles dans de futures études. Le nombre de 12 a été déterminé tout d'abord car il permettra, a priori, d'avoir une première approche de la variabilité du phénotype si phénotype il y a. Par ailleurs, il s'agit du nombre de femelles qui peuvent nous être cédées par l'élevage dans le cadre d'une réduction de son cheptel de reproductrices. Douze chiennes porteuses d'âge moyen (3 à 7 ans) seront examinées deux jours consécutifs par IRM, sous anesthésie générale afin de diminuer le stress de l'examen (bruyant) et de maintenir les animaux immobiles. Un examen d'enregistrement holter de leur électrocardiogramme sera également effectué, afin de déterminer si certaines anomalies observées chez les chiens malades et supposées liées à la fibrose seraient également identifiées chez leurs mères, ce qui permettrait également de proposer un tel examen de dépistage chez les mères de patients. A l'issue de ces acquisitions de données grâce à des outils non invasifs également utilisés en clinique, les chiennes seront euthanasiées afin que le cœur puisse être prélevé et analysé en termes de pathologie et d'analyses biochimiques. Avant le début des acquisitions de données, les chiennes bénéficieront d'un temps d'adaptation à leur nouvel environnement d'au moins une semaine. Tout le temps de leur séjour dans notre unité, les chiennes seront hébergées ensemble (en binômes), avec des jouets à disposition, et des sorties quotidiennes. Aucune douleur n'est attendue au cours de ce projet. La principale de nos préoccupations sera le stress subi par ces femelles du fait de leur arrivée dans de nouveaux locaux, et des manipulations, même si celles-ci seront limitées. La complexité d'un remodelage myocardique issu de plusieurs années d'évolution dans un contexte hétérozygote pour la myopathie de Duchenne, et le développement d'outils non invasifs de détection quantitative de la fibrose *in vivo* ne peuvent être modélisés *in vitro*, et nous contraignent à avoir recours à des animaux, les chiens étant dans ce contexte le modèle le plus proche de la situation humaine, tant par la taille que par l'expression de la maladie.

10577 Le cancer appelé lymphome T angioimmunoblastique (AITL) correspond à une prolifération anormale de certaines cellules du système immunitaire, les lymphocytes T. Cette maladie cancéreuse se manifeste sous la forme d'un élargissement des ganglions. Son évolution est grave, avec une survie à 5 ans évaluée à seulement 30% des patients. Il est donc urgent de développer de nouveaux traitements ciblant ce lymphome.

Malheureusement peu de progrès ont été réalisés dans la prise en charge de ce lymphome, et les traitements n'ont pas évolué depuis plusieurs dizaines d'années. Ceci est en partie lié à l'absence

de modèles d'études de ce lymphome. En effet, il est impossible de cultiver les cellules tumorales au laboratoire et d'établir des lignées représentatives de ce lymphome, ce qui freine considérablement la compréhension de la maladie et le développement de thérapies innovantes.

Récemment, plusieurs groupes ont montré que les cellules de cancers (prélevées sur les patients) peuvent se développer dans des souris immunodéprimées (privées de système immunitaire). Ces modèles de xénogreffes représentent un progrès majeur et permettent de tester de nouvelles approches thérapeutiques. Notre laboratoire travaille depuis de nombreuses années sur l'AITL, et a identifié deux traitements pouvant être efficaces dans ces lymphomes.

Ce projet consiste à :

- 1) Etablir des modèles de xénogreffe de cellules de lymphome dans les souris.
- 2) Déterminer l'efficacité et le mode d'action des deux nouveaux traitements ; établir les facteurs de réponse ou de résistance à ces traitements.

En se basant sur les données de la littérature, nous avons évalué la quantité de souris nécessaire et suffisante à la conduite de ce projet à 810 souris sur 5 ans. Ce nombre permettra de conclure avec certitude sur l'efficacité des traitements testés, en réduisant au minimum le nombre d'animaux engagés. Les procédures chirurgicales (implantation de tumeurs en sous cutanée ou injection) sont largement documentées et seront réalisés sous anesthésie. Cette implantation n'induit qu'une gêne modérée pour l'animal. De même, des publications récentes ont montré que les traitements testés par la suite ne sont pas toxiques pour la souris. Nous pouvons alors prédire que ces procédures seront peu dommageables pour l'animal.

Enfin, notre personnel expérimenté assurera une veille quotidienne des animaux sur la base de points précis et observables, pour anticiper et prévenir tout signe de souffrance. Les critères évalués comprendront entre autres, la fréquence de toilettage, le poids ou la mobilité. Au niveau de l'élevage, nous prendrons les dispositions nécessaires pour assurer le bien-être des animaux. Les souris ne seront pas séparées les unes des autres pour conserver leurs interactions sociales. Aussi, des capsules de gel nutritif seront ajoutées dans la litière pour assurer l'alimentation des souris si les tumeurs gênent les déplacements des animaux. Si cette gêne persiste ou si tout signe de souffrance est remarqué, les souris seront retirées du protocole.

10578 Généralement, les patients atteints de cancer sont traités par des chimiothérapies cytotoxiques interférant avec la division cellulaire. Cette stratégie qui induit la mort des cellules en cours de division présente deux problèmes : (i) de par leur manque de sélectivité cellulaire, les traitements entraînent une grande toxicité due à la mort des cellules normales se divisant ; (ii) les patients développent fréquemment une chimiorésistance.

L'origine et la progression du cancer requièrent un ensemble de modifications de la cellule. Parmi ces modifications, une mutation qualifiée de « pilote » est l'évènement à l'origine, et soutenant la croissance des cellules tumorales. Récemment, des thérapies ciblées qui interfèrent avec des molécules nécessaires pour la croissance tumorale ont été développées. Un nombre important de ces thérapies ciblées a été déjà approuvé au niveau clinique, ce qui a amélioré les résultats du traitement contre le cancer. Malheureusement, à ce jour, les mutations pilotes entraînant 45% des adénocarcinomes pulmonaires humains sont inconnues. De plus, il n'existe pas de thérapie ciblée pour environ 70% des adénocarcinomes pulmonaires. De ce fait, ces tumeurs sont traitées à l'aide de chimiothérapies traditionnelles avec des alternatives thérapeutiques très limitées et présentant un taux de survie de 15% après 5 ans.

Il convient de noter, que le développement de résistance à ces chimiothérapies est dans la plupart des cas lié à une activation d'une voie de signalisation cellulaire couramment à l'origine d'un tiers des adénocarcinomes pulmonaires et pour laquelle il n'existe pas de traitement ciblé. Une meilleure connaissance des réseaux moléculaires impliqués dans l'initiation et le développement de ces tumeurs permettra une meilleure compréhension de leurs biologies et ainsi la conception de thérapies ciblées efficaces contre ce type d'adénocarcinome pulmonaire ainsi que contre les tumeurs du poumon qui ont développé une résistance.

Nous avons récemment généré, dans des lignées de cellules d'adénocarcinomes pulmonaires, des mutations additionnelles d'un maillon clef de cette voie de signalisation cellulaire permettant d'interférer avec son expression, sa localisation cellulaire ou ses mécanismes d'activation. Nous avons maintenant pour objectif de déterminer si ce maillon clef peut être ciblé dans le traitement de tumeurs. Pour cela, nous implanterons ces lignées de cellules cancéreuses pulmonaires, contenant les mutations, à des animaux pour évaluer si ces mutations peuvent interférer avec le développement et l'agressivité des tumeurs et donc représenter des cibles thérapeutiques. Nous validerons cette approche en testant des composés chimiques ciblant le maillon clef afin de mimer sa mutation.

A ce jour, aucune méthode alternative ne permet de récapituler fidèlement le tissu vivant et l'utilisation d'animaux de laboratoire (souris) reste nécessaire pour générer des tumeurs comparables à celles apparaissant chez l'Homme. Les procédures d'injection de cellules chez la souris et la génération de tumeurs sont déjà couramment utilisées et optimisées dans l'équipe de recherche ce qui aura pour avantage d'utiliser un nombre réduit d'animaux par expérience. Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences 360 animaux. Dans le respect de la règle des 3R, nous combinerons nos études dans le but de restreindre le nombre d'animaux. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort. Un suivi de la croissance tumorale, sans manipulation engendrant une douleur ou un stress de l'animal sera réalisé chaque semaine et un suivi journalier des animaux sera réalisé en étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et l'équipe de recherche pour pouvoir agir rapidement et ainsi éviter tout inconfort ou souffrance des animaux. Enfin, les animaux seront hébergés par fratrie et à raison de 5 souris par cage. De plus, chaque cage sera dotée d'un enrichissement du milieu, comme des nids, afin de réduire le stress des animaux.

10579 Le récepteur aux minéralocorticoïde (MR) est une protéine exprimée classiquement dans le rein. Son activation par l'hormone aldostérone induit l'expression des gènes spécifiques contribuant aux transports rénaux de sel et d'eau ainsi qu'au maintien de la pression artérielle. Le MR est aussi exprimé dans les cellules du cœur, des vaisseaux, dans les neurones et la peau. Une activation chronique excessive du MR a été mise en évidence dans certaines pathologies humaines. Dans le domaine cardiovasculaire, des effets bénéfiques du traitement par des antagonistes du MR (bloquant son action) de patients présentant une insuffisance cardiaque ou un infarctus du myocarde ont été mis en évidence dans plusieurs études cliniques d'envergure.

Il a de plus été montré récemment que l'œil est une nouvelle cible minéralocorticoïde. Le MR est présent dans la neurorétine, l'épithélium pigmentaire et l'endothélium vasculaire rétinien et choroïdien. L'injection d'aldostérone dans l'œil du rat induit un œdème de la rétine et une dilatation et perméabilisation des vaisseaux choroïdiens, via des protéines spécifiquement exprimés dans l'œil. Il a aussi été montré que l'antagoniste du MR spironolactone (bloquant l'action du récepteur) a des effets bénéfiques chez les patients atteints de la chorioretinite séreuse centrale, une forme particulière de l'œdème rétinien, montrant l'importance de mieux comprendre le rôle du MR au niveau oculaire.

Pour étudier le rôle physiologique et pathologique du MR dans l'œil, nous utiliserons des souris transgéniques (MR-TG) générées précédemment où des copies supplémentaires du gène codant pour le MR ont été intégrées dans le génome, augmentant ainsi son expression. Ces copies supplémentaires s'expriment (surexpression) dans le rein, le cœur, le cerveau et le tissu adipeux, mais aussi dans l'œil. Une étude préliminaire a montré que les souris MR-TG présentent des œdèmes de la rétine. L'injection intraoculaire d'aldostérone, d'antagonistes MR et de solution contrôle (véhicule) dans un groupe d'animaux adultes normaux et MR-TG provenant des mêmes portées sera effectuée sous anesthésie pour étudier après euthanasie les caractéristiques histologiques de l'œil et les modifications dans l'expression de gènes et de protéines. Le nombre d'animaux utilisés sera de 54 de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour la comparaison des différents groupes et conditions. Les souris seront hébergées dans des conditions d'élevages enrichis de façon à améliorer leur bien-être. Il est à ce jour impossible de reproduire la complexité du tissu oculaire *in vitro* rendant indispensable l'utilisation de l'animal, pour une étude

qui a potentiellement un retentissement sur la santé humaine. L'injection, d'un microlitre de liquide seulement, se fera avec un microinjecteur et un capillaire, cette manipulation est bien tolérée chez la souris. L'effet sur la structure histologique de l'œil et sur l'expression des gènes modulés par le MR sera analysé après euthanasie des souris 24 heures après l'injection. La procédure décrite ci-dessus est modérée et ne demande pas de traitements particuliers à part la surveillance journalière et l'observation du franchissement éventuel des points limites.

10580 En France, la formation des médecins - et plus particulièrement des chirurgiens - repose en grande partie sur le compagnonnage au chevet du patient avec le système de l'internat. Toutefois, en termes de sécurité du patient, certains gestes gagnent à être pratiqués par les jeunes praticiens sur des modèles inertes (simulateurs, cadavres..) mais aussi sur des modèles animaux qui demeurent irremplaçables pour se familiariser avec le stress, les événements inattendus ou indésirables rencontrés au bloc opératoire. Le décret 2011-2116 a introduit l'obligation de formation continue pour les médecins en exercice et, pour les mêmes raisons, le recours à l'animal vivant demeure irremplaçable dans de nombreux cas.

Sur les aspects de justification de nombre nous prévoyons de former deux stagiaires par animal. Dans le présent projet, nous envisageons de réaliser sur des brebis deux procédures opératoires gynécologiques (hystérectomie par voie vaginale, ligatures vasculaires des artères iliaques internes). Pour les moyens de réduction de la souffrance des animaux, notre couverture analgésique habituelle à base de morphiniques, d'agonistes alpha-2 adrénergiques et de kétamine associée à une anesthésie à l'isoflurane donne des résultats satisfaisants pendant toute la phase per-opératoire. Suite à la procédure, les animaux ne seront pas réveillés. Nous envisageons d'utiliser deux brebis par séance de formation c'est à dire pour 4 chirurgiens et de répéter ces séances jusqu'à 10 fois par an soit un total de 100 brebis sur les 5 années de la durée du projet.

10581 Un nouveau produit d'intérêt (X) va être utilisé dans un protocole clinique de thérapie cellulaire en tant que réactif dans une culture de progéniteurs et cellules souches hématopoïétiques. Les cellules ont été cultivées avec le produit X selon les méthodes de production spécifiques au client. Ces cellules vont être utilisées comme médicament de thérapie cellulaire pour traiter le cancer lymphoïde humain. Il est nécessaire d'évaluer son potentiel de tumorigénicité dans un modèle murin pour compléter l'étude de tumorigénicité précédente.

Le protocole clinique inclura des patients pédiatriques (moins de 1 an), des deux sexes. La tumorigénicité sera donc évaluée dans des souris des deux sexes mais uniquement âgées de 3 semaines.

La dose du produit de thérapie cellulaire injectée chez la souris correspond à 10 fois la dose maximale que recevront les patients.

L'objectif principal de l'étude est d'évaluer le potentiel de tumorigénicité des cellules d'intérêt administrées par voie intraveineuse à des souris, afin de disposer de données de sécurité pour démarrer le développement clinique des cellules souches hématopoïétiques avec le produit d'intérêt. La dose de cellules testée correspond à 10 fois la dose maximale que recevront les patients.

Au total, 20 souris immunodéprimées seront utilisées :

- Groupe 1 : 5M/5F de 3 semaines injectés avec 100 µL de solution contrôle
- Groupe 2 : 5M/5F de 3 semaines injectés avec 100 µL des cellules d'intérêt

Les animaux seront injectés en intraveineux au sinus rétroorbitaire car l'âge des souris permet difficilement une injection en intraveineux à la veine caudale.

Les animaux seront gardés 90 jours puis seront euthanasiés pour prélèvements d'organes.

Ce projet a été validé scientifiquement auprès de l'ANSM et s'ancre dans un contexte réglementaire de phase préclinique.

Respect de la règle des 3Rs :

Remplacement : Le test de tumorigénicité a été testé sur des cellules. Il est maintenant indispensable du point de vue réglementaire de valider *in vivo* ce potentiel.

Réduction : Le nombre d'animaux a été réduit au maximum avec un n=5 pour les deux sexes et les deux groupes. Ce chiffre étant le minimum requis pour limiter la variabilité inter-individu.

Raffinement : Les animaux seront suivis quotidiennement afin de détecter tout signe de souffrance animale : prostration, apathie, etc. Un suivi hebdomadaire du poids permettra également d'identifier le point limite si une perte de poids de plus de >20% venait à être décelée.

10582 Selon l'organisation mondiale de la santé, une personne sur trois dans le monde souffre d'hypertension artérielle. Ce facteur de risque est à l'origine de la moitié des décès soit 9,4 millions de morts chaque année. Cette pathologie, caractérisée par une augmentation de la pression artérielle, est associée à des maux de tête le matin, des troubles visuels, des étourdissements mais également à une pollakiurie (envie fréquente d'uriner).

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur la fonction vésicale (calendrier mictionnel) chez des rats spontanément hypertendus (souche SHR) avec l'emploi de cages métaboliques reliées à un système de mesure permettant l'enregistrement du calendrier mictionnel de manière répétée (l'animal est son propre contrôle) sans modifier le comportement des animaux (ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture et sont libres de leurs déplacements).

Actuellement, les méthodes alternatives *in vitro* et *ex vivo* permettant d'étudier l'hypertension artérielle et ses conséquences sur la vessie n'existent pas, c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre et traiter cette pathologie.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux afin de contribuer à leur bien-être. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 180 rats, à raison de 9 animaux par groupe (minimum nécessaire), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

Les interventions chirurgicales seront effectuées sous anesthésie générale avec un maintien de la température corporelle de l'animal par l'utilisation d'un tapis chauffant. Les animaux seront surveillés pendant toute la durée de l'étude.

Dans le cas de prétraitements par des substances d'intérêt, un nombre minimal d'animaux sera utilisé pour réaliser l'étude en respectant la règle des 3 R.

10583 Les pontages vasculaires sont nécessaires dans de nombreux contextes médicaux. En effet, actuellement en France, 40.000 patients par an nécessitent une hémodialyse avec abord vasculaire et 18.000 pontages coronariens sont effectués chaque année. Dans ces deux cas, le traitement de référence consiste en l'utilisation des vaisseaux natifs du patient. Cependant la principale limite de cette intervention est la faible disponibilité de greffons sains (vaisseau utilisé lors d'une intervention précédente ou vaisseau de qualité insuffisante). Le recours à des prothèses vasculaires synthétiques est alors inévitable malgré leur important taux d'échec. Pour pallier ces limites, de nombreuses équipes de recherche ont démontré la faisabilité et l'intérêt de la production d'une nouvelle génération de substituts vasculaires entièrement biologiques d'origine humaine. De plus, les expérimentations *in vitro* menées au laboratoire ont démontré que les propriétés mécaniques de ce type de substituts vasculaires étaient satisfaisantes et compatibles avec une implantation orthotopique.

Ainsi, l'objectif général des expérimentations envisagées est d'étudier la fonctionnalité de cette nouvelle génération de substituts vasculaires entièrement biologiques d'origine humaine chez le rat immunodéficient en réalisant une implantation chirurgicale au niveau de l'aorte abdominale.

Ces expérimentations permettront d'évaluer la suturabilité des substituts vasculaires lors de la chirurgie. Leur capacité à faire circuler le sang et à résister à la pression à long terme, la réponse inflammatoire de l'hôte ainsi que le remodelage du substitut vasculaire par les cellules de l'hôte

seront étudiés à différents temps (1 mois, 3 mois, 6 mois, 12 mois) par échographie doppler et/ou microtomographie avec injection de produit de contraste ainsi que par des analyses histologiques.

Remplacement : Aucune étude *in vitro* ne permet d'étudier la fonctionnalité d'un substitut vasculaire dans un environnement multifactoriel tridimensionnel à long terme (présence de multiples types cellulaires, présence d'un flux, présence de sang frais).

Réduction : Ces expérimentations chez le petit animal permettront dans un premier temps, d'éviter le recours à d'autres espèces. Par ailleurs, ces expérimentations sont conçues pour avoir recours à un nombre minimal d'animaux permettant l'obtention des résultats exploitables sur le plan statistique. Tout d'abord, un groupe constitué au maximum de 6 rats sera nécessaire pour une étude préliminaire visant à valider la procédure expérimentale. Ensuite 6 animaux seront nécessaires pour chacune des 4 conditions expérimentales correspondant aux temps classiquement décrits dans la littérature (euthanasie à 1 mois, 3 mois, 6 mois et 12 mois). Ces expérimentations seront potentiellement effectuées 4 fois afin d'étudier des modèles de substituts vasculaires différents et/ou optimisés en fonction des résultats expérimentaux. Le premier modèle sera produit par tissage de fils de matrice extracellulaire synthétisée par des fibroblastes extraits à partir de peau humaine adulte saine. Le second sera produit par tissage de fils issus de la membrane amniotique humaine. Les troisièmes et quatrièmes modèles permettront de modifier le design de chaque type de substitut vasculaire en fonction des résultats obtenus avec les modèles précédemment cités. Au total, 102 rats sont nécessaires. Par ailleurs, la nécessité de données histologiques à différents temps ne permet malheureusement pas de réaliser un suivi longitudinal des animaux.

Raffinement : L'application de gel ophtalmique permettra de prévenir la sécheresse oculaire lors de la chirurgie. Une analgésie adaptée (buprénorphine, 0.2 mg/kg /q6 à 8h, injection sous-cutanée) sera réalisée en pré- et post-opératoire. Des conditions de stabulation appropriées seront mises en œuvre (isolement des animaux jusqu'à cicatrisation cutanée de façon à éviter la réouverture de l'incision). Les rats seront ensuite replacés en groupe avec des conditions d'hébergement et un milieu d'enrichissement adaptés favorables au bien-être de l'animal (présence d'une maison/tunnel par cage). Les rats seront suivis régulièrement pour détecter des signes de souffrance et traités pour corriger la situation ou euthanasiés si la situation ne peut être corrigée ou en cas de signes de paralysie des membres inférieurs. Les animaux seront euthanasiés par perfusion lors de la dernière observation sous anesthésie.

10584 Les cycles d'ischémie-reperfusion (i.e. arrêt puis restauration du flux sanguin et de l'apport en oxygène), qui se produisent lors des maladies des artères périphériques des membres inférieurs, induisent inévitablement des lésions du muscle squelettique qui peuvent réduire la capacité fonctionnelle et la qualité de vie des patients et conduire à l'amputation. Avec plus de 200 millions de personnes diagnostiquées dans le monde, les maladies des artères périphériques sont un problème de santé publique.

Bien que tous les mécanismes physiopathologiques associés à l'ischémie-reperfusion ne soient pas connus à ce jour, la dysfonction mitochondriale semble grandement contribuer aux altérations du muscle squelettique.

Les lésions de reperfusion sont amplifiées avec les comorbidités dans différents organes dont le muscle squelettique, et les traitements sont peu ou plus efficaces. Or, dans un contexte où les comorbidités associées aux pathologies sont de plus en plus présentes dans la population mondiale, les enjeux de santé sont importants et les mécanismes doivent être approfondis.

L'âge, défini comme le déclin des capacités fonctionnelles et de résistance au stress des tissus et organes de l'organisme avec le temps, est un facteur de risque des maladies des artères périphériques. Il participe à l'altération musculaire, via notamment une atteinte des fonctions mitochondriales. Pourtant, à ce jour, l'effet de l'âge sur les lésions d'ischémie-reperfusion du muscle squelettique, impliquant ou non la mitochondrie, a été très peu étudié.

Puisque les explorations des fonctions mitochondriales et du stress oxydant sont très limitées, et qu'aucune étude des fonctions mitochondriales après ischémie-reperfusion n'a été réalisée simultanément chez des animaux jeunes et âgés, de plus amples investigations sont nécessaires

pour comprendre la physiopathologie de l'âge dans l'ischémie-reperfusion du muscle squelettique, et pour développer ou adapter de nouveaux traitements protecteurs.

Les objectifs de ce projet sont de :

- Evaluer les conséquences de l'âge sur les fonctions mitochondriales après ischémie-reperfusion du muscle squelettique chez des souris normales.
- Déterminer si l'inhibition de la fission mitochondriale par le mDivi1, qui est protectrice dans l'ischémie-reperfusion d'autres organes, est protectrice dans le muscle squelettique, et si cette protection persiste avec l'âge. L'étude de cette voie thérapeutique, si elle est prometteuse, permettrait de développer une nouvelle stratégie thérapeutique chez l'Homme.
- Améliorer la compréhension des mécanismes mitochondriaux intervenant dans la physiopathologie de l'ischémie-reperfusion musculaire dans l'âge, en utilisant des modèles de souris transgéniques, notamment en modifiant la biogenèse mitochondriale et la balance énergétique spécifiquement dans le muscle squelettique.

Le présent projet nécessitera 100 souris, normales et transgéniques dont les caractéristiques correspondent à nos besoins.

Nous utiliserons un modèle murin d'ischémie (2h) reperfusion (2h) du membre inférieur par la méthode du tourniquet pour étudier les effets de l'ischémie-reperfusion sur les fonctions mitochondriales dans l'âge, au niveau du muscle squelettique.

Aussi, nous aimerions utiliser ce modèle pour tester des thérapeutiques novatrices et prometteuses modulant la dynamique mitochondriale pour protéger les muscles contre les effets délétères de l'ischémie-reperfusion chez les sujets jeunes et âgés. Ces thérapeutiques seront applicables chez l'Homme. Nous souhaitons utiliser le mDivi1, un inhibiteur de la fission mitochondriale qui protège de la mort cellulaire, à une dose connue dans la littérature pour entraîner un effet protecteur lors de l'ischémie-reperfusion d'autres organes.

Nous avons veillé à respecter au maximum la règle des 3R. Pour notre projet nous ne pouvons pas « remplacer » ce modèle animal par un autre modèle cellulaire puisque les altérations des tissus cibles lors de l'ischémie-reperfusion sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. En revanche, suite aux travaux antérieurs de notre laboratoire et puisque chaque animal est son propre contrôle (patte droite ischémisée-reperfusée vs patte gauche contrôle), nous avons « réduit » au maximum le nombre d'effectif par groupe (n=10/groupe) pour observer des éventuelles différences significatives. Nous utiliserons le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) pour réaliser des tests statistiques adaptés aux paramètres à évaluer (tests de Student, tests de variance unidirectionnelle (ANOVA) suivis de tests post-hoc). Enfin le « raffinement » consiste en un suivi journalier des animaux pour la durée de l'hébergement permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur état de santé. L'eau et la nourriture seront à volonté et des enrichissements seront à leur disposition dans les cages.

10585 La mise sur le marché de gonadotropines à usage vétérinaire (bovins, ovins, etc.) nécessite de réaliser, sur les matières premières, quelques dosages biologiques *in vivo* chez le rat pour les mettre en parallèle des dosages *in vitro* afin de n'utiliser que ces derniers pour les contrôles-qualité des lots de fabrication.

Le projet s'attachera à rechercher et optimiser les méthodes *in vitro* (dosages immunologiques, dosages sur cellules, dosages des glycanes, propriété physicochimiques) permettant d'anticiper l'activité biologique sur ces bases et donc de réduire le recours aux dosages *in vivo*.

Le nombre total d'animaux utilisés pour ces analyses, au bénéfice de deux fournisseurs français de eCG et FSH, sera d'environ 600 par an pour analyser 30 produits soit 3000 sur les 5 ans. Nous réussissons à réduire le nombre d'animaux en dosant différents produits contre une seule gamme, ou pas de gamme du tout (gamme historique basée sur nos expérimentations passées très reproductibles). En outre, notre expertise nous permet d'utiliser moins d'animaux que recommandé par la pharmacopée (4-5 rattes/gamme au lieu de 6-7).

La règle des 3R sera respectée comme suit :

Remplacement : seulement des dosages *in vitro* seront réalisés pour les contrôles qualité des lots de fabrication.

Réduction : le projet s'attachera à rechercher et optimiser les méthodes *in vitro* (dosages immunologiques, dosages sur cellules, dosages des glycanes, propriétés physico-chimiques) permettant d'anticiper l'activité biologique sur ces bases et donc de réduire le recours aux dosages *in vivo*. Notre expérience passée nous permet d'utiliser moins d'animaux que recommandé par la pharmacopée (4-5 rattes/gamme au lieu de 6/7). Nous avons pu observer la grande répétabilité des gammes de référence eCG et FSH, et dans de nombreuses expérimentations, nous nous affranchissons de la réaliser et mesurons l'activité des produits inconnus par rapport à des gammes " historiques" très reproductibles pour chacune des deux hormones.

Raffinement : les animaux auront des objets d'enrichissement (tubes cartonnés pour se cacher) dans les cages d'hébergement. Les manipulations se font dans le calme et avec douceur. D'après notre expérience, les animaux ne subissent aucune altération de leur état de santé. Cependant, si un animal présentait des signes cliniques tels que anorexie, abattement soudain ou prostration, nous consulterions le vétérinaire référent.

10586 Afin de tester un nouveau traitement pour les tumeurs cérébrales sévères chez le chien, il est impératif de tester préalablement son efficacité sur des lignées cellulaires tumorales canines qui doivent être parfaitement caractérisées. La capacité des lignées cellulaires à reproduire le type tumoral dont elles sont issues par implantation intra-cérébrale dans des souris immunodéficientes est l'étape de la caractérisation qui fait l'objet du présent projet.

Ce projet a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Ainsi, en application de ces principes :

- Cette étape de caractérisation nécessite l'utilisation d'animaux de laboratoire, car à l'heure actuelle, aucune méthode substitutive ne permet d'étudier l'ensemble des caractéristiques tumorales à partir d'une culture cellulaire. Les animaux utilisés sont des souris Nude car ce sont des porte-greffes tolérants dont l'absence de poils facilite la transplantation et la surveillance clinique après chirurgie.

- Il est prévu d'utiliser 150 souris Nude au total, soit 10 souris par lignée cellulaire, pour trois expériences indépendantes. Ce nombre est conforme aux données de la littérature relative à l'implantation intra-cérébrale de lignées cellulaires tumorales chez la souris immunodéficiente et permet d'avoir une bonne validité statistique des résultats, dans le respect des règles d'éthique animale.

- Les souris seront hébergées par groupe de 5 maximum dans des cages agrémentées de tunnels et d'igloos pour que les animaux aient une meilleure stimulation sociale. La greffe tumorale se fera sous anesthésie générale et la surveillance quotidienne sera assurée par un personnel qualifié de la zootechnie.

Par ailleurs, la caractérisation des lignées est une étape indispensable avant d'envisager des études basées sur leur utilisation : elle constitue donc une bonne pratique de laboratoire qui permettra, en mettant à la disposition de la communauté scientifique des lignées cellulaires dont la validité est attestée, d'éviter de futures expérimentations animales inutiles.

10587 Contexte : Pour créer un abord vasculaire pour permettre l'hémodialyse, ou pour créer un pontage en remplacement de petits vaisseaux sanguins périphériques ou coronariens obstrués (< 6 mm de diamètre interne), le chirurgien utilise des vaisseaux sanguins du patient lui-même. Malheureusement, ces vaisseaux viennent souvent à manquer lors d'interventions répétées suite à la progression d'une maladie par exemple. Dans cette situation, des prothèses vasculaires synthétiques sont utilisées mais avec de très mauvais résultats. Ainsi, de nombreux groupes de recherche ont émis l'hypothèse qu'une prothèse vasculaire entièrement biologique apporterait de meilleurs résultats qu'une prothèse synthétique, c'est pourquoi l'objectif de ce projet est de développer un substitut vasculaire entièrement biologique par ingénierie tissulaire, issu de

l'approche Cell-Assembled extracellular Matrix (CAM). Cette approche repose sur la production de feuillets composés de matrice extracellulaire synthétisée par des cellules maintenues en culture cellulaire. A partir de ces feuillets de CAM, des fils sont produits et utilisés afin d'assembler un substitut vasculaire par tissage. C'est à dire que ce procédé a pour objectif final de créer des vaisseaux à partir de cellules animales qui pourront être implantés.

Notre étude a montré que le modèle ovin semblait plus adapté pour produire des feuillets CAM. L'expérimentation envisagée consiste à étudier la réponse immunitaire de l'hôte suite à l'implantation sous-cutanée des fils produits à partir de feuillets ovins. Cette expérimentation permettra d'évaluer la réponse inflammatoire ainsi que le remodelage des fils à différents temps de suivi (1 mois, 3 mois et 6 mois) par des analyses histologiques et l'analyse des propriétés mécaniques des fils (avant et après l'implantation). Ces données nous permettront de sélectionner le procédé de création et de conditionnement des fils les plus adaptés pour tisser le substitut vasculaire.

Justifications liées au respect de la règle des 3R : Bien qu'un modèle humain puisse être largement étudié *in vitro*, son étude *in vivo* à long terme reste limitée. A ce jour, aucun système de modélisation ne peut suppléer à l'utilisation d'un modèle animal étant donné la complexité du système immunitaire. Des modèles animaux immunodéficients ou immunosupprimés notamment souris ou rats, ne peuvent pas mimer la physiologie humaine car ils sont trop petits. Ainsi, le développement d'un modèle de gros animal permettra d'évaluer, à long terme, la réponse immunitaire innée de l'hôte combinée à la réponse immunitaire adaptative dans un contexte de greffe allogénique (indisponible chez les animaux immunodéficients ou immunosupprimés) simulant les conditions cliniques (REPLACEMENT). Ces expérimentations sont conçues pour avoir recours à un nombre minimal d'animaux permettant l'obtention de résultats exploitables sur le plan statistique. Nous implanterons 21 brebis, ce nombre a été réduit au minimum tout en garantissant la fiabilité des résultats. Le renouvellement de ces expérimentations permettra d'effectuer des modifications et/ou optimisations des conditions expérimentales avec un criblage plus fin pour sélectionner le conditionnement de préparation du fil le plus adapté à la production du substitut vasculaire. Chaque animal sera son propre contrôle car toutes les conditions expérimentales seront implantées dans chaque individu, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux impliqués dans l'expérimentation (REDUCTION).

Le projet sera conduit dans des locaux agréés, avec du personnel dédié et expérimenté. Un protocole précis de prémédication, d'analgésie, d'anesthésie et d'euthanasie est mis en place (RAFFINEMENT) pour garantir au maximum la prise en compte du bien-être des animaux.

10588 La fibrillation atriale (FA) est la plus fréquente des arythmies cardiaques, touchant approximativement 3% de la population générale. Sa prévalence est en constante augmentation du fait du vieillissement de la population. Elle est associée à des complications fréquentes et sévères telles que les accidents vasculaires cérébraux, l'insuffisance cardiaque, les hospitalisations et les décès et représente un problème majeur de santé publique. Ce projet s'inscrit au niveau de la recherche fondamentale afin de trouver de nouveaux acteurs de la FA, afin de développer de nouveaux traitements.

L'aldostérone une hormone stéroïde dérivée du cholestérol est essentiellement synthétisée au niveau du cortex surrénalien, mais une synthèse extra-surrénalienne a plus récemment été mise en évidence dans différents tissus dont les cardiomyocytes. Son récepteur, le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR), est principalement exprimé dans les cellules épithéliales mais son expression a également été démontrée dans les cellules non épithéliales du système cardiovasculaire comme les monocytes/macrophages, les fibroblastes et les cardiomyocytes. Il a également été montré une association significative entre l'aldostéronémie et la survenue d'évènements cardiovasculaires majeurs dont la FA. De plus, certains modèles expérimentaux ont démontré une augmentation de l'expression du MR chez les patients avec FA, majorant les effets génomiques de l'aldostérone, ainsi qu'un effet pro-arythmogène de l'aldostérone au niveau de l'oreillette. Ces différents résultats suggèrent donc que l'aldostérone et le MR jouent un rôle à la fois dans la survenue d'arythmies atriales.

En parallèle des recherches sur le canal Transient Receptor Potential Melastatin 4 (TRPM4), un canal cationique non sélectif pour les ions monovalents (Na⁺ et K⁺), activé par le calcium intracellulaire ont montré l'implication de celui-ci au niveau cardiaque. En effet des travaux récents ont démontré son rôle dans l'activité électrique cardiaque et ses dysfonctionnements, ainsi que dans le remodelage cardiaque. Il a notamment été mis en évidence une activité atriale ectopique significativement plus élevée dans le groupe de souris invalidées pour le gène TRPM4 en comparaison au groupe sauvage ou wild type (WT), possiblement favorisée par le raccourcissement de la durée du PA. Cette activité atriale ectopique répétée et la modification de la durée du PA pourraient avoir un rôle dans la vulnérabilité atriale et l'induction de FA car il est maintenant reconnu qu'un raccourcissement ou qu'un allongement du PA atrial sont des mécanismes majeurs de FA.

Nous sommes donc ici en présence de deux acteurs récemment décrits comme étant impliqué dans la survenue de la FA. Notre objectif est de rechercher s'il existe des interactions entre l'aldostérone et le canal TRPM4 au niveau atrial, à l'origine d'un remodelage structurel et électrique défavorables et d'une inductibilité de la FA accrue afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Ce travail nécessite l'utilisation de souris, le recours à des modèles alternatifs n'étant pas opportun car trop de la physiologie. Nous utiliserons une souche de souris dont le gène TRPM4 est éteint (TRPM4^{-/-}) chez laquelle nous reproduirons le modèle de référence d'hyperaldostéronisme chez les rongeurs communément appelé modèle « aldostérone-sel ». Les données obtenues chez ces animaux seront comparées à celles obtenues chez des animaux contrôles C57Bl6.

Dans cette étude nous utiliserons 4 groupes de souris (nombre minimale afin de pouvoir comparer nos différents résultats) : contrôle WT, Aldostérone WT, contrôle TRPM4^{-/-}, aldostérone TRPM4^{-/-}. Dans un souci de réduire le nombre d'animaux nous utiliserons 20 souris par groupe qui est le nombre minimal pour obtenir des résultats statistiquement comparables fiables. 10 souris par groupe pour des mesures électrophysiologiques et 10 pour les études de biologie moléculaires et d'histochimie. 20 autres souris seront utilisées pour la mise au point des techniques soit un nombre total de 100 animaux.

Ce travail nécessite l'utilisation de souris, le recours à des modèles alternatifs n'étant pas opportun car trop éloigné de la physiologie. Nous nous intéressons à une interaction physiopathologique complexe que l'on peut réaliser uniquement grâce à la souris KO pour le canal TRPM4. De plus le remplacement n'est pas possible dans cette étude puisque le remodelage électrique ne peut être correctement étudié que sur l'organe en entier. Enfin il n'existe pas de lignée cellulaire cardiaque appropriée.

Concernant le raffinement des conditions expérimentales, les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes (type IV). La nourriture, la boisson et la litière seront changées une fois par semaine. La litière de peuplier "aspen small", plus douce et variée pour les animaux permet de réduire le niveau de stress et possède les avantages d'être peu poussiéreuse, moins allergisante que le résineux. Les animaux sont hébergés par groupe de 5 afin de conserver les interactions sociales. La litière est enrichie avec de la litière cellulose Alpha Dry permettant la confection de nid, ainsi qu'une cabane en carton leur permettant ainsi de se cacher durant la période d'exposition à la lumière. A la suite des procédures, un suivi régulier est effectué pendant 7 jours par du personnel formé et expérimenté. Une attention particulière sera accordée dans les premiers jours post-opératoires. La perte de poids (plus de 10% de perte par rapport au poids avant chirurgie), l'aspect des poils et le comportement de l'animal par rapport à ses autres congénères seront surveillés étroitement (matin et soir) pendant 7 jours après chirurgie. Nous suivons les indications de recommandations de la "Mouse Grimace Scale" dès les premières heures post-chirurgie pour effectuer une analyse de l'état de la santé de l'animal. Si un animal a un score strictement supérieur à 4 en suivant cette échelle, la procédure d'euthanasie sera effectuée. L'analgésie post-opératoire est assurée par une injection de 0,5 mg/kg de méloxicam et par une injection de buprénorphine à la dose de 0,05 mg/kg. Elle est ensuite relayée par une injection sous-cutanée de buprénorphine à la dose de 0,05 mg/kg toutes les 12 heures pendant 3 jours.

10589 La capacité de garder en mémoire une expérience est essentielle pour la survie des organismes supérieurs. Cette capacité est en partie assurée par une structure cérébrale appelée hippocampe.

Cette structure est composée de cellules appelées "neurones". Ces derniers sont connectés entre eux, et sont capables de modifier leurs connexions en fonction des informations qu'ils reçoivent, autrement dit, ils sont capables de « plasticité synaptique ». Les informations qu'ils reçoivent peuvent les activer ou les rendre silencieux. Toutes les informations reçues sont précisément intégrées de manière à coder et transmettre au mieux les messages nerveux.

Ces mécanismes sont connus pour être importants pour le stockage de la mémoire. Une des sous-régions de l'hippocampe (CA3) est impliquée dans la mémoire des événements vécus dans leurs contextes, appelée « mémoire épisodique ». Des modélisations par ordinateur ont permis d'émettre l'hypothèse que cette sous-région serait particulièrement importante pour développer la représentation instantanée d'un contexte.

Pour pouvoir confirmer ces hypothèses, il est nécessaire d'étudier le fonctionnement *in vivo* des circuits de neurones du CA3, ainsi que le rôle joué par la plasticité synaptique dans ses circuits. Pour ce faire nous utiliserons un modèle animal transgénique dans lequel ces circuits sont affectés. Le projet propose d'étudier le fonctionnement des circuits du CA3 *in vivo*, à l'aide d'enregistrements de l'activité électrique des neurones chez la souris anesthésiée. Grâce à une technique appelée « optogénétique », il sera possible d'activer ou de rendre silencieuse une population de neurones en les stimulant avec de la lumière. Ces manipulations permettront d'enregistrer la réponse de certains neurones après activation et/ou inhibition d'autres neurones, et donc de mieux comprendre le fonctionnement des circuits du CA3 intacts. Nous étudierons également l'effet sur la mémoire à travers des expériences comportementales.

Le projet utilise donc des approches fonctionnelles (electrophysiologie) et comportementales. Le planning général des expériences comprend plusieurs étapes 1) la chirurgie stéréotaxique, 2) des expériences de comportement 3) un prélèvement de tissu vivant après anesthésie pour pouvoir réaliser des analyses electrophysiologiques *in vitro* sur tranche des circuits de la mémoire 4) des expériences electrophysiologiques *in vivo*.

Dans le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) les mesures suivantes seront prises : (1) Le même animal sera utilisé pour différents protocoles comportementaux afin de réduire le nombre total (réduction) ; (2) Les protocoles comportementaux seront suivis par des analyses immunohistochimiques afin de réduire et d'optimiser l'utilisation des animaux (réduction et raffinement) et (3) L'utilisation de systèmes simplifiés (neurones en cultures ou lignées cellulaires) ne peut reproduire le circuit neuronal. Dans chaque expérience, des précautions seront prises pour diminuer l'impact stressant et douloureux des procédures expérimentales (utilisation d'analgésiques locaux, suivi post-opératoire, régulation thermique, contrôle de la fonction respiratoire). La souris est une espèce de choix pour les études sur le système nerveux central des Vertébrés. L'organisation du système central de cette espèce est assez proche de celle de l'homme, ce qui permet une extrapolation des résultats obtenus. Nous utilisons le modèle souris qui est l'espèce de rongeurs permettant d'obtenir aisément des animaux modifiés génétiquement. Le modèle utilisé ici n'a pas de phénotype dommageable.

Les données electrophysiologiques sont difficiles à obtenir, l'expérience du laboratoire a montré que plusieurs animaux (4-5) sont nécessaires pour obtenir un enregistrement exploitable et en extraire des conclusions correctes. Les protocoles comportementaux exigent un minimum de 15 animaux par condition expérimentale.

Pour la totalité de ce projet, 480 souris seront donc nécessaires et ce chiffre tient aussi compte des différents contrôles à effectuer.

10590 Les pathologies du système nerveux central (SNC) sont difficiles à traiter puisque pour être efficace, le médicament administré va devoir passer au travers de la barrière hémato-encéphalique. La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une structure dynamique, remarquablement efficace pour protéger le milieu cérébral mais limitant également la distribution au cerveau des agents thérapeutiques administrés par voie systémique. En effet, la BHE contrôle par des processus d'entrée et de sortie quelles molécules présentes dans le sang pourront passer dans le milieu liquide qui baigne le cerveau (LCR pour liquide céphalo-rachidien). Aujourd'hui, environ 98 % des

médicaments envisageables pour soigner les pathologies du système nerveux central, et tout particulièrement le cerveau, ne franchissent pas ou trop peu la BHE, limitant la quantité de médicament disponible dans le cerveau. Il est donc important de développer de nouvelles voies d'administration afin de faciliter le passage de la BHE et augmenter ainsi la quantité de médicament délivré au cerveau.

La voie intranasale pourrait permettre de contourner les barrières traditionnelles à l'entrée du SNC, en favorisant un transport direct dans le cerveau via les nerfs olfactifs et trigéminés, comme le soulignent plusieurs études chez l'animal.

L'objectif principal de ce projet est de comparer deux voies d'administration (voies orale et nasale) pour un médicament ciblant le SNC afin de déterminer la plus pertinente.

Le primate non humain (PNH) a été choisi car l'organisation de ses cavités nasales est similaire à celle de l'Homme et qu'il permet une administration ciblée/sélective du médicament dans certaines cavités nasales (contrairement à la souris).

Le nombre de PNH nécessaire à ce projet est de 3.

Les expériences ont été planifiées afin de répondre à la règle des « 3R » :

Remplacer : les modèles *in vitro* (modèles anatomiques de cavités nasales) bien qu'utiles pour optimiser les dispositifs d'administration, et utilisés en amont de cette étude, ne permettent pas de rendre compte de la biodistribution d'un médicament dans différents compartiments de l'organisme et sont donc insuffisants pour établir une preuve de concept de la supériorité d'une voie d'administration.

Réduire : Il ne s'agit en aucun cas de faire des analyses statistiques puisqu'il s'agira de produire des données qualitatives sur un petit nombre d'animaux. 3 animaux étant le minimum nécessaire pour prendre en compte la variabilité inter-individuelle (paramètres respiratoires). Chaque animal recevra le médicament par voie orale et par voie nasale (après une période d'élimination du médicament par l'organisme), permettant à chaque animal d'être son propre contrôle.

Raffiner : L'imagerie ainsi que les prélèvements sanguins et de LCR (réalisés aux même temps) seront réalisés sous anesthésie générale. Les animaux seront hébergés ensemble en volière en accord avec la réglementation européenne en vigueur (enrichissement social). Concernant l'enrichissement, les animaux disposent dans leur hébergement, de plateformes surélevées, de tunnels, de jouets. La distribution de l'aliment couvre les besoins journaliers et est complétée par une distribution de friandises (fruits, légumes, pâtes, riz, pop-corn, céréales, graines de tournesol...) deux fois par jour. Les friandises données sont différentes le matin et l'après-midi, et d'un jour à l'autre. Il est possible d'en cacher certaines dans des jouets afin de stimuler la recherche alimentaire des animaux.

10591 Les infections pulmonaires aiguës sont caractéristiques de nombreuses maladies dues au dysfonctionnement de notre système de défense comme dans le sepsis, les maladies du vieillissement, les inflammations chroniques et les immunodéficiences. La cause commune principale de ces infections est une déficience de notre réponse immunitaire innée portée par les phagocytes. Une enzyme clé de cette défense est la NADPH-oxydase (NOX). Son dysfonctionnement dans la granulomatose septique chronique (CGD) entraîne des infections sévères et récidivantes dès le plus jeune âge. Il s'agit d'une maladie génétique rare (1/200 000, environ 500 patients en Europe). La forme la plus fréquemment rencontrée est celle causée par des mutations du gène CYBB codant pour la sous-unité membranaire NOX2 du complexe NADPH oxydase, de transmission liée à l'X (CGDX) (70% des cas).

Elle doit donc être diagnostiquée le plus tôt possible pour protéger l'enfant par un traitement antibiotique prophylactique à vie. La transplantation de moelle allogénique peut être proposée lorsque cela est possible, mais n'est pas dénuée de dangers. La thérapie génique a donné des résultats prometteurs mais le type et le "design" du vecteur viral à utiliser est encore en test pour le sécuriser. De plus ce traitement est très onéreux et n'est pas encore applicable à un grand nombre de patients. La première cause de décès des patients est l'infection pulmonaire réfractaire aux traitements antibiotiques systémiques conventionnels. Dans ce contexte un traitement local et ciblé

en cas d'infections pulmonaires graves et réfractaires aux traitements conventionnels, serait d'une grande utilité pour les malades CGD.

L'objectif principal de ce projet est de faire la preuve de concept de l'efficacité d'une thérapie protéique dans la CGD. Notre projet a pour ambition de développer une nouvelle thérapie pour traiter les infections pulmonaires aiguës chez les patients CGDX réfractaires aux traitements conventionnels. Nous n'aspérons pas à guérir définitivement les patients CGDX, mais nous sommes très enthousiastes à l'idée que notre travail pourrait être utile pour prévenir le décès lors d'infections pulmonaires sévères. Récemment, nous avons publié des résultats très encourageants sur la production d'un complexe NOX2 *in vitro* capable de fusionner avec la membrane de macrophages CGDX humains. L'efficacité des liposomes NOX2 (PL) sera testée sur un modèle de souris CGDX de pneumopathie. Les données cliniques et biologiques seront analysées pour déterminer la chronologie de l'administration.

Le but de ce projet est de démontrer que les PL optimisées NOX2 seraient un médicament préventif et/ou curatif efficaces contre les infections pulmonaires sévères chez les souris CGDX. Cette étude préclinique est l'étape nécessaire pour proposer un essai clinique expérimental aux patients CGDX. Cette thérapie pourra également être appliquée à d'autres infections sévères dans différentes maladies infectieuses et d'immunodéficiences.

Tout sera mis en œuvre lors de cette étude pour respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) : En effet, nous avons déjà réalisé l'ensemble des expériences *in vitro*, et il est maintenant nécessaire d'évaluer l'efficacité des PL NOX2 dans des organismes vivants, porteurs d'une CGDX. Nous avons également limité au maximum le nombre d'animaux sans compromettre les besoins pour des statistiques robustes. Enfin, les animaux seront hébergés en groupe avec enrichissement du milieu de vie et un suivi de leur bien-être sera réalisé quotidiennement. Les animaux seront anesthésiés lors des procédures d'infection et de traitement. Pour ce projet 118 souris seront nécessaires.

10592 La myopathie de Duchenne est une maladie génétique dans laquelle une protéine, la dystrophine, est absente. Cette maladie touche le muscle chez l'enfant, provoquant une faiblesse musculaire généralisée et évolutive. Les patients sont contraints à l'usage du fauteuil roulant vers l'âge de 10 ans, et décèdent d'insuffisance respiratoire ou cardiaque vers l'âge de 30 ans. Il n'existe pas, à ce jour, de solution thérapeutique pour la myopathie de Duchenne. Différents modèles de cette maladie permettent de travailler sur l'élaboration des médicaments, depuis les modèles *in vitro*, jusqu'aux modèles animaux. Toutefois, seul le contexte du chien atteint spontanément par cette maladie, le chien GRMD (golden retriever muscular dystrophy), reproduit de manière fidèle les manifestations cliniques et fonctionnelles rencontrées chez les patients. Lorsqu'un médicament a fait ses preuves sur des modèles *in vitro* puis dans le modèle murin, et qu'il a des chances réelles d'arriver au chevet du patient, son efficacité chez le chien GRMD permet d'envisager un passage en clinique prometteur, du fait de la valeur translationnelle forte des données obtenues chez les chiens.

Les stratégies thérapeutiques les plus prometteuses actuellement font appel à la thérapie génique, soit en agissant très spécifiquement à l'étape de maturation du message entre le code génétique et la construction de la protéine (stratégie de « saut d'exon thérapeutique »), soit en apportant un mini-gène de la dystrophine (« micro-dystrophine ») qui ne garde que des secteurs essentiels à sa fonction. Le projet présenté ici a pour objectif de tester une nouvelle stratégie de saut d'exon thérapeutique, mais en agissant cette fois directement sur le code génétique et non sur l'étape suivante, par le système CRISPR-Cas9. L'avantage que pourrait présenter cette méthode sur celle existante est le fait que la correction sera permanente et que nous attendons un effet thérapeutique qui se maintiendra sur le long terme, d'autant plus si nous parvenons à cibler les cellules satellites, qui sont la réserve de régénération du muscle.

Le présent projet a pour objectif de réaliser les étapes précliniques de mise au point de cette nouvelle stratégie, en la confrontant à une stratégie existante. 35 chiens seront inclus.

Les constructions CRISPR seront testées *in vitro* sur des myotubes GRMD, puis les constructions les plus efficaces seront testées *in vivo*, dans un premier temps par des injections intra-musculaires

qui permettront de confirmer leur efficacité en conditions réelles, après prélèvement de biopsies des zones injectées. La question de la correction du génome des cellules satellites sera également posée grâce à un protocole de régénération induite. Enfin, une étude dose-réponse sera effectuée afin de vérifier si cette relation est comparable aux stratégies précédemment testées. Ces étapes d'injections locales feront appel à un maximum de 10 chiens GRMD âgés entre 5 et 9 mois.

Une seconde phase de l'étude vise à comparer cette stratégie d'édition génomique, cette fois à l'échelle de l'organisme entier, avec une stratégie d'addition de gène (micro-dystrophine optimisée). Pour ce faire, 25 chiots GRMD âgés de 3 semaines, répartis en 5 lots (étude en double aveugle) recevront une injection intraveineuse soit d'un placebo, soit d'un vecteur viral codant pour la micro-dystrophine (2 doses différentes), soit d'un vecteur viral codant pour le système CRISPR (2 doses différentes). Les chiens seront ensuite suivis jusqu'à leurs trois ans, les seuls actes invasifs étant le prélèvement de biopsies musculaires (indispensables ici à la démonstration de la réexpression de dystrophine) et de sang. Dans un souci de raffinement, les autres méthodes d'évaluation feront appel à des outils cliniques non invasifs (IRM, tests de locomotion, de respiration, échocardiographie etc.). Des groupes de 5 chiens sont nécessaires et suffisants pour démontrer, s'il existe, un bénéfice franc (attendu dans le cadre d'une thérapie génique). Le chien GRMD est un modèle de myopathie de Duchenne incontournable au stade préclinique pour obtenir des réponses que des modèles *in vitro* ne pourraient pas fournir, de par la complexité de cette maladie et les multiples fonctions altérées. L'utilisation de ces animaux requiert une expertise dans leur maintien, des soins spécifiques et adaptés leur sont donc prodigués pour leur permettre de vivre dans les meilleures conditions possibles, en respectant leurs exigences comportementales avec le souci de maintenir des interactions intra- et inter-spécifiques fortes (hébergements et sorties en groupes, jeux et caresses avec les animaliers). Des sorties quotidiennes avec jouets et pataugeoires quand le temps le permet sont organisées, pour ces chiens qui gardent un instinct de chiens d'eau et de rapport. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance prolongée et inutile ont par ailleurs été définis.

10593 L'ischémie-Reperfusion des membres inférieurs est un problème de santé publique, causant des dommages irréversibles aux tissus voire à l'organisme entier et mettant en jeu le pronostic vital. L'ischémie se caractérise par un manque d'oxygénation d'un tissu, secondaire à une interruption de la circulation sanguine au niveau d'une artère. La reperfusion, nécessaire pour sauver le membre s'accompagne cependant d'une majoration des atteintes musculaires (atteinte des mitochondries, centrales énergétiques de la cellule), attribuée surtout à la libération des radicaux libres. Cette situation est très fréquente dans la pratique de la chirurgie vasculaire au cours de laquelle le clamp artériel induit une ischémie, suivie d'une reperfusion lors du déclampage. La recherche de stratégies en vue de la protection des muscles et des organes, notamment permettant de réduire les dysfonctions mitochondriales post-ischémie-reperfusion, est un des défis à relever. Nous avons montré que le peptide natriurétique de type B protège le muscle squelettique contre les effets délétères de l'ischémie-reperfusion probablement en augmentant la guanosine 3',5'-monophosphate cyclique. Sachant qu'une inhibition de la phosphodiesterase de type 5 par le sildénafil augmente la guanosine 3',5'-monophosphate cyclique, notre objectif est de vérifier l'hypothèse que le sildénafil protège le muscle ischémié. Le présent projet sera réalisé avec 60 souris. La règle des 3R a été prise en compte dans l'élaboration des procédures. Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible car les altérations des tissus cibles lors de l'ischémie-reperfusion sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. La réduction des effectifs est liée à l'utilisation de techniques et à une approche statistique adaptée (ANOVA et/ou test non-paramétriques). Ainsi, nous avons vérifié au préalable que la patte controlatérale pouvait servir de témoin dans ce modèle d'ischémie-reperfusion unilatérale, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux participant au travail tout en conservant la puissance statistique nécessaire. Enfin, le raffinement se fait par une prise en compte du bien-être animal (groupement des animaux pour éviter le stress dû à l'isolement, enrichissement du milieu dans la cage par ajout de coton et de morceau de bois et soins quotidiens aux animaux). Les animaux seront surveillés pendant tout le temps de la procédure pour vérifier la profondeur de l'anesthésie. En cas de signes de réveil ou de souffrance en cours pendant le protocole (réaction

motrice à la stimulation douloureuse d'une patte) ou de signe de détresse de l'animal, l'anesthésie sera approfondie par augmentation de la fraction inhalée d'isoflurane. En cas de détresse ou de souffrance persistante sous anesthésie, l'animal sera euthanasié par dislocation cervicale.

10594 La thématique globale du présent projet porte sur la compréhension des mécanismes par lesquels les acides biliaires et leurs récepteur nucléaire FXR régulent la thermogenèse adaptative. Cette dernière participe à l'homéostasie énergétique faisant intervenir différents organes comme le système nerveux central /périphérique et le tissu adipeux brun. Le récepteur nucléaire FXR et ses agonistes naturels agissent tel des senseurs métaboliques permettant à l'organisme de s'adapter aux changements environnementaux en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie énergétique et le métabolisme glucidique, lipidique ou des acides biliaires. Il est d'ailleurs exprimé dans les tissus importants d'un point de vue métabolique (foie, tissu adipeux, muscle, pancréas, cerveau, intestin). Des anomalies dans la fonction du récepteur FXR sont à l'origine de perturbations métaboliques au cours desquels des modifications du pool d'acides biliaires peuvent être observées. Aussi, l'objectif du projet est d'étudier plus avant le rôle du récepteur nucléaire FXR dans la régulation de la thermogenèse adaptative dans le contexte du contrôle central de l'homéostasie énergétique par des approches intégratives (protocole de mise au froid, prise de température, mesure du tonus sympathique et parasympathique, histologie, biochimie, méthodes moléculaires). Ce projet nécessite donc des approches intégrées utilisant des modèles murins d'activation pharmacologique de FXR au sein du système nerveux central ainsi que des modèles d'inactivation tissu spécifique. Le nombre total d'animaux concernant les procédures de notre projet sur les 5 ans à venir est estimé à 448. Notre projet répond aux exigences des 3R à savoir remplacement, réduction et raffinement. Le remplacement : Des expériences préalables ont été réalisées sur des cultures cellulaires afin de démontrer la preuve de concept de la nécessité de ces expériences. La réduction : Le nombre total d'animaux concernant les procédures de ce projet sur 5 ans est estimé à 448 souris. Le nombre d'animaux par groupe pour obtenir des résultats significatifs a été déterminé par des tests statistiques Cette utilisation maximise les données obtenues de chaque animal, ce qui peut limiter ou éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Le raffinement : Nous serons attentifs à observer si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être animal (un examen clinique sera mis en place afin d'évaluer le plus précisément possible les premiers signes de stress ou de douleur afin d'en limiter les conséquences (en excluant l'animal de l'étude en s'assurant d'avoir le nombre suffisant pour l'analyse statistique).

Dans le cas de traitements pharmacologiques, seuls les composés ayant démontré leur innocuité seront utilisés. Particulièrement, nous serons attentifs aux paramètres cliniques suivants, définissant les points limites :

-perte de poids de 15% ou plus (et, le cas échéant variations de l'ingestion de nourriture et d'eau) :
-apparence physique externe (piloérection, dos rond, signes d'infection, respiration anormale.) -
changement du comportement (hypoactivité, démarche anormale, isolement)^[1]_{SEP}-réponses comportementales au stimulus externe

Les animaux présentant un de ces critères seront euthanasiés par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane 2%.

10595 Le cerveau est très riche en lipides et plus particulièrement en acides gras polyinsaturés (AGPIs) omega-3 et omega-6. Ces derniers sont impliqués dans la formation de la myéline, qui est une substance qui sert à protéger les neurones et assurer la bonne conduction de l'influx nerveux. Des données suggèrent que la consommation d'omega-3 est essentielle pour maintenir l'efficacité de la myélinisation (processus de synthèse de la myéline) chez des nourrissons prématurés et chez des individus psychotiques ou âgés. Le fer joue un rôle central dans le processus de myélinisation pendant le développement cérébral. Or, au laboratoire nous avons mis en évidence une déficience du métabolisme du fer chez les animaux carencés en omega-3. Cependant, les études disponibles

sur l'interaction entre la consommation en omega-3 et la myélinisation restent limitées et aucun mécanisme n'a encore été élucidé.

Notre projet vise à étudier les conséquences d'une variation des apports nutritionnels en omega-3 sur la myélinisation chez la souris. Les animaux seront issus de mères nourries avec un régime déficient ou supplémenté en omega-3 au cours de la période périnatale. Ils seront ensuite maintenus sur le même régime que leur mère jusqu'à l'âge adulte. Il a été montré que cela induisait des changements significatifs de la composition en omega-3 du cerveau des souriceaux, et ce de façon durable.

Dans une première série d'expérience, nous étudierons l'effet de l'injection d'un potentialisateur de la myélinisation sur les animaux carencés en omega-3.

Dans une deuxième série d'expériences, nous nous intéresserons par ailleurs aux potentiels effets protecteurs d'une supplémentation en fer sur la myélinisation, chez les animaux carencés en omega-3.

Nous analyserons l'état fonctionnel des fibres de myéline grâce à des techniques d'imagerie. Dans l'ensemble, les anomalies associées aux fibres de myéline sont liées à des altérations des fonctions cognitives. Nous étudierons donc le comportement de ces animaux par une batterie de tests comportementaux. Nous caractériserons l'état de la myéline au cours du développement, grâce à des techniques de microscopie et diverses analyses moléculaires.

Ce travail sera le point de départ pour l'identification des mécanismes impliqués et à plus long terme pour développer des stratégies nutritionnelles et/ou pharmacologiques pour améliorer la connectivité cérébrale chez des individus atteints de troubles.

Nombre total d'animaux utilisés : 700

Règle des 3Rs :

« Remplacer » : L'étude des régimes alimentaires nécessite l'utilisation d'animaux vivants. De même, les comportements ne peuvent être étudiés que sur des animaux vivants et vigiles.

L'objectif général du projet vise à étudier les conséquences d'une carence nutritionnelle en omega-3 sur la myélinisation chez la souris. Pour se faire, nous utilisons des tests *in vivo*, et dans ce contexte, bien que certaines études soient développées sur des modèles cellulaires pour traiter les aspects neurobiologiques, le recours à des modèles animaux pertinents et adaptés aux études *in vivo* reste donc une nécessité expérimentale afin d'appréhender la réalité physiologique de nos résultats. Une recherche d'alternatives et d'autres méthodes dans des bases de données démontre que les solutions de rechange appropriées à ces procédures ne sont pas disponibles, et qu'aucun duplicata du travail proposé n'est aujourd'hui identifié.

« Réduire » : La solidité de nos hypothèses de travail en utilisant des groupes de 7 animaux pour les données biologiques et neurobiologiques et de 15 animaux pour le comportement pour des statistiques fiables, et la qualité de la mise en œuvre des procédures, basée sur l'expertise des expérimentateurs, permettront de contrôler le nombre des animaux.

« Raffiner » : Les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures, soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupe sociaux le plus longtemps possible. Ils auront à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après les différentes expérimentations. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

10596 La vaccination par la voie intranasale vise à protéger les animaux contre un pathogène qui pénètre dans l'organisme par cette voie. Cette stratégie vaccinale présente en outre l'avantage d'être non invasive (pas d'aiguille) et peut être envisagée en cas de vaccination de masse d'un troupeau. La

vaccination à ADN est une alternative vaccinale récemment découverte qui présente l'avantage de ne pas utiliser un agent infectieux, ce qui est bénéfique pour la biosécurité vaccinale. Dans ce cas, le vaccin est composé d'une molécule d'ADN codant la protéine vaccinale. Si on administre ce type de vaccin tel quel par voie intranasale, il sera rapidement détruit par certains composants de la muqueuse. C'est pourquoi il doit être transporté par un vecteur qui le protégera de la dégradation et lui permettra en sus d'atteindre son lieu d'action.

Notre objectif est de développer la vaccination à ADN par voie intranasale chez le porc pour induire une protection immunitaire vis-à-vis de pathogènes porcins contaminant le porc par la voie nasale. Dans un premier temps, nous avons sélectionné 4 vecteurs déjà utilisés dans le cadre de la vaccination à ADN par voie intranasale, mais pour d'autres espèces animales que le porc. Puis nous avons vérifié *in vitro* que ces vecteurs sont bien actifs pour véhiculer l'ADN dans des cellules en culture.

Ces 4 vecteurs doivent maintenant être évalués pour leurs capacités à permettre au vaccin ADN d'induire une réponse immunitaire chez le porc suite à une inoculation par voie intranasale. Pour cela, un ADN plasmidique vaccinal connu pour induire une forte réponse immunitaire chez le porc, le plasmide codant la glycoprotéine B du virus de la pseudorabie porcine, sera associé à chacun de ces 4 vecteurs et sera ainsi administré à des porcs par voie intranasale à 3 reprises, à une semaine d'intervalle. Il est à noter que l'administration de ce plasmide n'entraîne aucune réaction adverse chez le porc. Les réponses immunitaires seront recherchées jusqu'à au moins 3 semaines après la dernière inoculation. A la suite de ces investigations, un essai de protection vaccinale proprement dit pourra être réalisé à l'aide du vecteur le plus efficace identifié ici.

Les vecteurs seront évalués au cours de deux procédures expérimentales qui seront menées dans le respect de la règle des 3R : réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique (au total N=27 animaux) ainsi que le raffinement des conditions d'hébergement. Ces mesures de raffinement viseront à assurer des conditions d'hébergement limitant l'angoisse potentielle des animaux (eau et nourriture à volonté, lampes chauffantes, jouets, etc.) Les animaux seront observés quotidiennement. Si toutefois, l'infection conduisait à une altération de l'état de santé, les animaux concernés seront euthanasiés en cas d'atteinte des points limites. En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable, les animaux utilisés étant nécessaires pour évaluer l'immunogénicité d'un vaccin inoculé par la voie nasale chez le porc. Il n'existe pas en effet de lignée cellulaire pouvant imiter la complexité du système immunitaire porcine.

10597 Les cancers sont un enjeu capital de santé publique avec plus de 12 millions de nouveaux cas dans le monde en 2008 (et une incidence prévisionnelle de 15 millions de cas en 2020) et bien que des progrès majeurs aient été réalisés durant cette dernière décennie, ils demeurent la 1ère cause de mortalité chez l'homme et la 2ème chez la femme. Il existe donc un vrai besoin médical chez ces patients réfractaires aux traitements usuels et sans alternative thérapeutique.

Les premières indications envisagées pour ce nouveau traitement seront des maladies orphelines : les cancers du sang tels que les lymphomes non hodgkiniens et les leucémies aiguës. Il s'agit de maladies hautement prolifératives et graves, dont le pronostic vital est souvent engagé.

Les traitements proposés aujourd'hui pour ces pathologies ont grandement amélioré le pronostic de ces patients : ils associent des poly chimiothérapies et de l'immunothérapie ainsi que des thérapies ciblées. Des traitements plus lourds comme les autogreffes ou des allogreffes de cellules souches hématopoïétiques peuvent être proposés mais ceux-ci sont en général réservés aux patients de moins de 65 ans compte tenu de leur toxicité.

Malheureusement, ces stratégies ne sont pas toujours curatrices, en particulier chez les sujets âgés qui ne peuvent bénéficier des traitements intensifs.

Les phases de rémission sont le plus souvent suivies de rechutes successives dans un délai variable en raison des résistances aux différents traitements proposés aboutissant à terme à une impasse thérapeutique et le décès en quelques semaines.

Ce projet a pour objectif d'obtenir des informations sur de potentiels phénomènes d'hypersensibilité (choc anaphylactique) suite à l'administration par voie intraveineuse d'un nouvel anticorps

monoclonal en administrations répétées, potentiel nouveau traitement contre les leucémies et lymphomes. Le modèle animal de choix est le primate non-humain compte tenu de sa grande proximité phylogénique avec l'Homme et en particulier du fait des similitudes immunologiques, mais également car il a été choisi pour les études précédentes sur ce projet.

Règle des 3Rs : Etant donné que des éléments sur la tolérance à ce nouveau traitement (administrations espacées dans le temps et administrations répétées) sont déjà disponibles, un nombre réduit de macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*) sera utilisé (réduction) soit 6 animaux au maximum. Le remplacement du recours au modèle primate est impossible ici car les précédentes études de tolérance ont été réalisées chez le primate. La maladie n'a pas besoin d'être induite chez ces animaux puisqu'on ne cherche pas encore à connaître l'efficacité du traitement mais à déterminer si des phénomènes d'hypersensibilité peuvent être observés. Afin de limiter les contraintes pour les animaux (raffinement), toutes les interventions se feront sous anesthésie générale avec suivi des animaux après injection, quotidien et hebdomadaire. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec des programmes d'enrichissement et de socialisation.

10598 La maladie de Crohn est une maladie intestinale inflammatoire caractérisée par une réponse immunitaire inflammatoire aberrante contre des organismes inoffensifs du microbiote intestinal. Il n'existe pas aujourd'hui de traitement curatif de la maladie de Crohn. Les médicaments actuels sont pour la plupart bien tolérés et permettent de maîtriser la maladie. Malheureusement, certains patients ont développé une maladie de Crohn réfractaire. C'est pourquoi de nouveaux outils thérapeutiques ont été étudiés pour la contrôler. Une stratégie prometteuse consiste à injecter au patient des cellules tolérogènes qui temporisent la réponse inflammatoire. On parle alors de thérapie cellulaire. Au sein de notre unité, nous travaillons sur des protocoles de thérapie cellulaire à l'aide de cellules tolérogènes dans des modèles de greffes chez l'animal.

Notre équipe a plus particulièrement montré l'efficacité d'une population de cellules immunorégulatrices appelée ATDC (Autologous Tolerogenic Dendritic Cells) dans plusieurs modèles de transplantation chez le rongeur. Ces cellules expriment fortement le récepteur à la fractalkine (CX3CR1), comparé à d'autre population de cellules myéloïdes. Or dans la littérature, cette molécule est associée à des propriétés tolérogènes. En particulier, l'injection de phagocytes mononucléés intestinaux CX3CR1^{high} permet de protéger des souris de l'induction de la colite. Ces éléments nous amènent à penser que la molécule CX3CR1 a un rôle clef dans l'effet tolérogène des ATDC et que ces cellules pourraient avoir un rôle protecteur dans un modèle de colite.

Le premier objectif de ce projet est d'étudier si les ATDC sont capables de protéger les souris de l'induction d'une colite. Le second objectif est d'étudier le rôle du récepteur à la fractalkine dans l'effet tolérogène des ATDC au sein de ce modèle.

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit :

- Remplacer : Cette étude ne peut être réalisée chez l'homme sans résultats préalables. De plus, le même niveau d'information ne pourra être apporté par des études *ex vivo*, *in vitro* ou *in silico*. En effet, nous souhaitons évaluer l'efficacité des cellules sur la réponse immune complexe présente dans plusieurs organes lors d'un contexte d'inflammation lié à une colite. Cette étude nécessite donc l'utilisation d'un organisme entier et vivant. C'est pourquoi nous ne pouvons pas nous affranchir de l'utilisation d'animaux dans ce projet.

- Réduire : le nombre d'animaux est réduit à 564 (voir point 6.4.10), nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (calcul des effectifs à l'aide de la formule $n = (\sigma^2 / |\mu_1 - \mu_0|^2)(Z\alpha + Z\beta)$, sur les critères de poids et de score). Le nombre de groupe a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

- Raffiner : Un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos voûté, agressivité...) sera réalisé. De plus, des scores seront établis pour évaluer la sévérité de la colite. Les animaux seront pesés tous les jours et s'ils atteignent une perte de poids de 20% par rapport à leur poids le plus élevé, ceux-ci seront euthanasiés. Les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal-être tel qu'un changement de comportement seront eux aussi euthanasiés. De plus, afin de réduire l'angoisse, un produit d'enrichissement (coton de nidation) est

placé dans les cages. Durant le protocole, une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée. Les animaux traités avec les ATDC et ceux du groupe contrôle seront analysés afin d'obtenir un maximum d'information post mortem : au niveau anatomopathologique pour les lésions de l'intestin, et les autres organes pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action. Les résultats obtenus permettront de déterminer l'importance de la molécule CX3CR1 dans l'efficacité tolérogène des ATDC pour traiter la colite.

10599 Le projet de l'équipe est de comprendre les mécanismes des déficiences intellectuelles dans la trisomie 21 (T21) ou syndrome de Down. La T21 est due à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Elle touche 1 nouveau-né pour 600-800 naissances et représente environ un tiers des déficiences intellectuelles chez les enfants d'âge scolaire. C'est la forme la plus fréquente de retard mental, qui est également associée à un large panel de dysmorphologies.

Pour l'étude de ce syndrome nous avons choisi le modèle murin parce que la souris partage beaucoup de systèmes communs avec l'homme au niveau anatomique, cellulaire, biochimique, et moléculaire. En outre, les fonctions cérébrales de souris fonctionnent de façon similaire avec l'homme. Ainsi on retrouve chez ces petits rongeurs, des comportements comme l'inquiétude, l'agression, la mémoire et d'autres réponses émotives. Au niveau génétique, la souris est proche de l'homme. Les gènes portés par le chromosome 21 se trouvent chez la souris, dans 3 régions. Ces 3 régions sont réparties sur 3 chromosomes différents. On retrouve la plus large région sur le chromosome murin n°16 (119 gènes), puis une petite région sur le n°17 (20gènes) et finalement une petite région sur le chromosome n°10 (42 gènes).

Pour aller plus loin dans l'étude de ce syndrome, nous avons réussi à créer un chromosome supplémentaire chez la souris. Ce chromosome comporte l'ensemble des gènes porté par le chromosome 16 murins (gènes homologues au chromosome 21 humain). Cela en fait le meilleur modèle murin pour la trisomie 21 existants à l'heure actuelle puisqu'il a un chromosome de plus, comme dans la condition chez l'homme et 65% des gènes liés à la pathologie sont en 3 copies.

Ce nouveau modèle sera analysé du point de vue morphologique, cognitif et physiologique afin de mettre en évidence les défauts présents dans la pathologie humaine. En particulier l'hyperactivité, le retard d'apprentissage, le retard de division cellulaire, la vision, l'épilepsie et une analyse des anomalies de la face. Il devrait permettre aussi de disséquer les mécanismes impliqués dans la pathologie et pourra également servir pour tester de nouvelles voies thérapeutiques comme preuve de concept avant une application chez l'homme.

Les objectifs sont de :

- 1) Comprendre les origines physiologiques et développementales de la pathologie.
- 2) Identifier les voies moléculaires perturbées.

Règle des 3R :

Remplacement : Le retard mental chez les patients T21 prend son origine très tôt au cours du développement embryonnaire. La compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires ainsi que les origines développementales de la pathologie requièrent l'étude d'un organisme vivant dans son intégrité et sa globalité et il n'existe donc pas de méthode autre que l'étude *in vivo*. D'autre part, la souris est la seule espèce physiologiquement et génétiquement assez proche de l'Homme dans laquelle nous pouvons réaliser les manipulations génétiques pour obtenir ces modèles de pathologies humaines.

Réduction : Ce modèle passera dans une série des tests comportementaux allant du moins stressant au plus stressant afin de minimiser le nombre de souris utilisées. Ces tests sont choisis en fonction des déficits décrits dans la pathologie humaine. Les souris commencent le premier test à l'âge de 12-13 semaines. Entre 5 et 10 tests sont réalisés pendant une période allant de 5 à 10 semaines. En général, 2 cohortes de 30 souris mâles (15 trisomiques et 15 contrôles) sont requises pour une analyse comportementale complète et une troisième cohorte femelle est requise afin de répéter les tests dans lesquels un phénotype a été vu pour le valider chez les femelles. La totalité de ces expériences nécessiteront donc l'utilisation de 90 souris. Ce nombre est basé sur une analyse statistique prospective, en fonction de notre expérience pour atteindre des résultats

exploitables de manière statistique. Les données obtenues sont généralement de distribution normale, la statistique utilisée sera un test ANOVA avec test de Turkey en post-hoc. A l'issue de ces tests, un lot d'animaux (5 de chaque génotypes) seront utilisés pour un enregistrement électroencéphalogramme, de façon à déceler de l'épilepsie, présente dans la pathologie T21. Les autres animaux seront euthanasiés pour des analyses histologique et moléculaire.

Raffinement : l'ensemble des tests comportementaux n'entraîne pas de souffrance sévère pour l'animal. Cependant, comme le suivi du bien-être animal est primordial pour le bon déroulement des analyses comportementales, tout au long du projet, les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé à tout temps.

10600 Avec plus de 48 000 nouveaux cas détectés en France chaque année, le cancer du sein est le plus fréquent des cancers chez la femme. Lors d'un diagnostic du cancer du sein, les tumeurs sont analysées et classées en fonction de certaines caractéristiques moléculaires qui permettent de guider la prise en charge de la patiente. 10 % à 20 % des cancers du sein sont définis comme triples négatifs. Il n'existe à ce jour aucune thérapie ciblée efficace pour traiter les femmes atteintes de cette forme de cancer. Seule la chimiothérapie permet de réduire de 30% la mortalité de ce type de cancer. Ces cancers du sein "triples négatifs" sont particulièrement agressifs avec de nombreuses récurrences et par conséquent associés à un mauvais pronostic. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour ce type de tumeur est donc cruciale pour l'amélioration de la prise en charge des patientes. L'analyse moléculaire de plus de 448 cancers du sein cliniques, a permis d'établir une relation entre l'expression du gène codant RPC32alpha et ces cancers triples négatifs. Nos études *in vitro* sur des cellules cancéreuses montrent que cette protéine pourrait être une cible thérapeutique majeure pour traiter ces cancers particuliers. Nous devons maintenant confirmer ces résultats par une étude *in vivo*, sur un modèle murin, étape nécessaire pour obtenir la validation de cette cible thérapeutique dans un contexte physiologique.

Nous utiliserons donc 210 souris sur 3 ans, nombre minimal pour nous assurer de la fiabilité des résultats et ne pas avoir à refaire ces expériences.

Dans le respect de la règle des 3R,

Remplacement : Tous les tests *in vitro* et cellulaires possibles ont été faits en amont de cette étude et montrent le rôle très important de cette protéine dans la tumorigénicité des cellules de cancer du sein. Cependant, les tumeurs sont des modèles intégrés qui font intervenir un grand nombre de mécanismes physiologiques et de tissus avoisinants qui ne peuvent être modélisés *in vitro*. Nous devons donc avoir recours à un modèle physiologique complet et fonctionnel pour cette dernière étape : le modèle animal.

Réduction et Raffinement : Nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. Nous utiliserons des cellules transduites avec un vecteur exprimant la luciférase, système très sensible qui nous permettra à la fois de réduire le nombre d'animaux utilisés mais également de détecter l'apparition de cellules tumorales très précocement permettant ainsi d'améliorer le bien-être animal par une prise en charge plus rapide. De plus, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort, des points limites sont définis et contrôlés de manière régulière. Les animaux seront hébergés en groupe et l'enrichissement de leur milieu de vie sera systématique.

10601 La thématique du laboratoire est centrée sur les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), dont font partie la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC). Les MICI, caractérisées par une réponse inflammatoire incontrôlée de la muqueuse intestinale, sont indéniablement des maladies multifactorielles liées à notre environnement (mode de vie, alimentation, microbiote...). La fumée de cigarette est l'un des facteurs environnementaux qui affecte les MICI, mais avec des effets opposés. En effet, le tabagisme est l'un des facteurs de risque le plus important associé à la MC ; à l'inverse, les patients atteints de RCH sont plus fréquemment des non-fumeurs ou ex-fumeurs. Les mécanismes responsables sont actuellement méconnus. Il est proposé qu'à l'instar du poumon, le tabagisme puisse stimuler la production de mucus par la muqueuse colique, compensant ainsi le déficit de mucosécrétion caractéristique de la RCH. Par

ailleurs, des études effectuées sur des lignées cellulaires ont permis d'avancer sur la compréhension du mode d'action du tabac, montrant notamment un effet sur le stress du reticulum endoplasmique, voie dérégulée chez les patients atteints de RCH. Mais les lignées cellulaires disponibles ne sont pas des modèles de MICI, et si ces études permettent d'avoir une idée des mécanismes touchés par le tabagisme, reste à comprendre ce qu'il en est au niveau d'un organisme entier et dans un contexte de MICI.

Dans un premier temps nous souhaitons utiliser deux modèles murins de MICI afin d'étudier les effets physiopathologiques du tabagisme :

- les souris IL10/Nox1dko sont connues pour développer des caractéristiques de la RCH humaine. Ce modèle nous permettra d'étudier l'effet du tabac en curatif ainsi qu'en préventif.

- les souris IL10ko/NOD21007fs sont disponibles au laboratoire et présentent les caractéristiques cliniques et histologiques de la maladie de Crohn humaine. Ce modèle nous permettra d'étudier l'effet aggravant du tabac dans la maladie.

Dans un second temps, et afin de comprendre la mécanistique sous-jacente, nous étudierons l'action du tabac *ex vivo* sur le tube digestif des souris (effet dose et cinétiques sur différentes voies de signalisation).

Des analyses statistiques ont été réalisées afin de déterminer le nombre optimal (et donc minimal) d'animaux nécessaires par groupe pour valider une différence significative si elle existe. Un effectif de 10 souris par groupe a été estimé nécessaire pour la réalisation du projet (avoir des résultats reproductibles et observer une différence significative, si elle existe, avec un risque alpha inférieur à 5% et un risque bêta inférieur à 10%), soit 100 souris au total.

Les études de la physiologie gastro-intestinale ne peuvent être réalisées que sur des animaux (aucun système cellulaire ne permettant de reproduire le développement de l'intestin *ex vivo*). De plus, nos études reposent sur l'analyse de marqueurs caractéristiques des MICI, marqueurs cliniques (diarrhées, rectorragis, prolapsus...) et histologiques (colite, iléite, abcès cryptique, érosions de la muqueuse, perméabilité de la barrière épithéliale) observables que sur un animal entier. Ces deux modèles murins présentent un phénotype dommageable lié à une atteinte inflammatoire spontanée du tube digestif. Mais ce projet permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'amélioration et de détérioration de deux pathologies aux conséquences lourdes, et ainsi de contribuer à la découverte de nouvelles thérapies ciblées.

Ce projet, d'une durée de 3 ans et impliquant des modèles murins, s'effectuera en respectant la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Le bien-être animal sera toujours une préoccupation majeure de ce projet. Toutes les dispositions visant à prévenir le stress et la douleur seront appliquées. Les animaux sont regroupés à 5 par cage pour limiter l'angoisse liée à l'isolement avec accès à l'eau et nourriture *ad libitum*. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification afin de favoriser leur bien-être. Les animaux en expérimentation sont surveillés par un personnel qualifié. Tout changement significatif (jeûne, prostration, poil hérissé, perte de poids des animaux) alertera et pourra conduire rapidement à l'euthanasie de l'animal concerné. Une perte de plus de 20 % du poids initial sera considérée comme point limite et conduira à l'euthanasie de l'animal.

10602 Le développement de nanoparticules pour la délivrance de médicaments ou d'agents d'imagerie dans le contexte de la nanomédecine rencontre un intérêt croissant. Dans ce contexte, une étroite collaboration établie avec des équipes de chimistes nous amènent à valider, par imagerie *in vivo*, différentes formulations de nanoparticules afin d'une part d'imager leur biodistribution et d'autre part de mesurer leurs performances diagnostiques. Avant d'envisager une étude chez l'animal, l'absence de toxicité des nanoparticules sera vérifiée. Nous travaillerons avec des souris qui auront une tumeur sous cutanée. Cette tumeur sera obtenue après l'injection de cellules cancéreuses génétiquement modifiées sous la peau.

La demande des chimistes étant de plus en plus importante, nous prévoyons de tester une dizaine de nanoparticules par an, à raison de 6 souris par lots, soit 60 souris par an. Le projet étant sur 5 ans, soit un total de 300 souris.

L'utilisation des animaux est indispensable pour reproduire les mécanismes complexes liés aux tumeurs et il n'y a pas d'autres alternatives pour étudier la bio distribution d'une molécule. Seules les nanoparticules ayant un réel intérêt seront testées chez l'animal. Les techniques d'imagerie que nous utilisons sont non invasives et permettent de réaliser un suivi dans le temps sur un même animal, ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés au final. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et un enrichissement du milieu est fourni par l'animalerie. Toutes les procédures sont réalisées sur animal anesthésié et lors de l'anesthésie les animaux sont placés sur un tapis chauffant. Les animaux sont quotidiennement suivis par le personnel de l'animalerie en étroite collaboration avec l'expérimentateur. Au moindre signe de souffrance et/ou de mal être de l'animal l'expérimentation sera stoppée. Ces signes sont les suivants : nécrose de la tumeur, gêne occasionnée par la tumeur (dans le déplacement notamment), comportement anormal de l'animal (isolation, prostration, arrêt du toilettage).

10603 Notre programme de recherche porte sur l'identification des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson (MP).

Cette maladie est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente en France, après la maladie d'Alzheimer. C'est une maladie complexe, d'étiologie encore inconnue, caractérisée par une destruction d'une population spécifique de neurones, et l'accumulation dans le cerveau d'une protéine pathologique : l' α -synucléine (aSyn). La nouvelle technologie de reprogrammation cellulaire présente la possibilité de créer des systèmes cellulaires humains de MP, qui permettent d'étudier les mécanismes de transmission de aSyn pathologique. Le but de ce projet est l'étude du comportement de précurseurs neuronaux humains provenant de cellules souches pluripotentes induites iPS, après leur transplantation dans le bulbe olfactif de souris. Ces cellules iPS sont issues de la reprogrammation cellulaire de fibroblastes de la peau d'un sujet sain et d'un patient avec Parkinson familial (mutation G209A dans le gène aSyn, entraînant l'expression de la forme pathologique A53T de cette protéine) et d'un sujet sain

Nous administrerons au souris une neurotoxine entraînant une destruction des neurones similaire à celle observée dans la MP. Nous étudierons l'expression de aSyn et son trafic dans le cerveau à partir des cellules transplantées.

Ce programme de recherche devrait permettre d'identifier les causes cellulaires et moléculaires de la MP, en particulier d'élucider les mécanismes de propagation de la forme pathologique de aSyn dans le cerveau. Les données générées permettront d'améliorer les pratiques cliniques de traitement de ces affections et leurs conséquences économiques majeures.

Ce projet repose sur le recours à des souris de laboratoire. Des cultures cellulaires seront utilisées mais elles ne rendent pas compte de la complexité de la propagation de aSyn pathologique dans le temps et dans les structures cérébrales, d'où la nécessité d'utiliser un modèle animal. Ce projet utilise le seul modèle expérimental murin permettant de suivre *in vivo* la transmission de l' α synucléine pathologique.

Nous respecterons la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) en limitant à 560 souris sur 5 ans le nombre d'animaux statistiquement nécessaire pour mener à bien ce projet. Le degré de sévérité des procédures appliquées aux souris est modéré, en raison de l'administration intra crâniale de neurotoxines et de cellules humaines. Les animaux seront surveillés quotidiennement après cette opération chirurgicale. Afin de limiter les dommages pour les animaux, nous utiliserons systématiquement une anesthésie et une analgésie chaque fois que cela est indiqué.

10604 La plateforme de Neurophysiologie *in vivo* du petit animal proposera des prestations et/ou une mise à disposition des équipements et œuvrera pour le développement de l'exploration neurophysiologique des modèles rongeurs de pathologies du système nerveux central et périphérique. En plus du développement, la plateforme formera les utilisateurs à diverses méthodes (mesure et chirurgie d'implantation). La plateforme utilisera donc des lots d'animaux à des fins

éducatives et de recherche et développement. La règle des 3 R a été considérée pour la mise en place du projet :

-Réduction du nombre d'animaux suffisants pour permettre des données statistiquement fiables. Les études *in vivo* développées dans ce projet permettent des approches fonctionnelles sans euthanasie de l'animal permettant un suivi pendant plusieurs mois réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisé

-Raffinement le stress/fatigue/douleur de l'animal est réduit à son maximum par l'utilisation d'analgésiques et d'anti-inflammatoires en post-opératoire et une surveillance rapprochée des animaux jusqu'à l'euthanasie

-Remplacement. Les animaux ne peuvent pas être remplacés dans ce type d'expériences. La culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas toutes les propriétés.

Nous estimons à 2 750 souris le nombre de souris dans les 5 ans pour ce projet.

10605 Les maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington (MH) sont une préoccupation croissante en terme de santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de cette maladie.

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

Nous avons déjà établi la preuve de concept de notre stratégie dans deux modèles murins (souris) pour la maladie de Huntington où la surexpression d'une enzyme du métabolisme du cholestérol à l'aide d'un vecteur adéno -associé (AAV) qui permet de corriger les anomalies neuropathologiques et comportementales chez la souris malade.

Le but final de cette étude est de compléter toutes les étapes précliniques avant de proposer cette approche thérapeutique chez les patients à un stade précoce de l'évolution de la maladie de Huntington.

Pour cela nous avons besoin d'optimiser les conditions de l'injection stéréotaxique et d'évaluer la tolérance chez une autre espèce de rongeurs, en particulier, le rat (volumes et titres/concentrations de vecteurs injectés). Différents lots de vecteurs à différentes concentrations seront évalués dans le cadre d'études de toxicité chez le rat sain en utilisant des conditions cliniques portant sur l'effet bénéfique potentiel du vecteur dans deux modèles murins pour la MH.

Remplacement : Le recours aux modèles animaux est essentiel, car aucun type de culture cellulaire ou système synthétique ne permet à ce jour de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles. Tous les vecteurs AAV et les préparations utilisées seront caractérisés *in vitro* avant leur utilisation chez l'animal. Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité dans des élevages agréés.

Raffinement : Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage/utilisation, et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe certifient le bien-être des animaux. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les rats recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Réduction : Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. Leur nombre (68) a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider la tolérance d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être considérée comme cible dans plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, des travaux précédents, dans d'autres espèces (souris) ont permis d'établir les concentrations/doses de virus à

injecter et les temps d'analyses. Enfin l'utilisation du modèle rat nous permettra de démontrer la possibilité de réaliser les études de Toxicité dans ce modèle et ainsi d'éviter le recours aux primates non humain.

10606 Notre projet s'inscrit dans le cadre d'une formation d'utilisateurs à des gestes techniques de chirurgie stéréotaxique sur la souris de laboratoire, se déroulant sur 3 jours.

Il s'agit d'une formation qui est complémentaire à la formation réglementaire concepteur ou praticien et à la formation d'initiation à la chirurgie.

Nous souhaitons proposer, chaque année, à 12 participants (chercheurs, ingénieurs, techniciens, étudiants.) de se former à 5 techniques chirurgicales stéréotaxiques sur la souris. Il s'agit de 5 techniques chirurgicales qui sont très souvent utilisées pour répondre à des questions scientifiques dans des domaines de la neurologie et des neurosciences. Il s'agit des techniques suivantes : l'injection cérébrale et l'analyse du cerveau, trois types de canulations cérébrales et enfin le prélèvement de liquide céphalorachidien.

Outre l'apprentissage de différents types de dispositifs stéréotaxiques, cet atelier couvre également la prise en charge des animaux en période post-opératoire (suivi post-opératoire, définition des points limites, prise en charge de la douleur), comment lire une échelle Vernier et un atlas cérébral, comment positionner les animaux pour réussir la chirurgie stéréotaxique (mise dans les barres d'oreille).

Le nombre d'animaux utilisés pour ce projet sera donc au maximum de 840 souris sur 5 ans.

Pour réduire le nombre d'animaux selon la règle des 3R, nous utilisons, pour ce projet de formation, uniquement des animaux issus de la zone d'élevage d'un de nos établissements et qui sont destinés à une euthanasie pour mauvais génotype. En effet, dans une portée de souris hétérozygotes en accouplement, un certain nombre de souris est euthanasié car leurs génotypes n'entrent pas dans l'étude scientifique du chercheur.

Dans ce projet de formation, il s'agit donc d'une récupération des animaux d'élevage de mauvais génotype à des fins de formation scientifique. Les souris transgéniques, conservées pour cette formation, ne présentent pas de phénotype dommageable et aucun phénotype particulier visible.

Pour apprendre à réaliser des gestes chirurgicaux précis, il n'existe aujourd'hui aucun modèle non vivant qui pourrait mimer le modèle animal vivant. Nous n'avons donc pas la possibilité de remplacer le modèle vivant utilisé pour cette formation chirurgicale stéréotaxique.

En terme de raffinement, les souris sont hébergées par 6 au maximum dans des cages sur des portoirs ventilés. Elles ont constamment accès à de la nourriture et de l'eau. Pour que les souris puissent réaliser un nid, nous ajoutons des morceaux de coton ou de papier kraft. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement par du personnel compétent. Les points suivants seront considérés comme points limites :

1. Tout dérèglement physiologique aboutissant à une incapacité prolongée ou irréversible à se nourrir ou à boire
2. Modification du comportement caractéristique d'une douleur intense, une détresse ou une souffrance (absence de locomotion, pelage hérissé et/ou terne, prostration, dos vouté)
3. Anomalies pouvant entraîner une douleur intense, une détresse ou une souffrance : plaies et ulcères, tumeurs, fractures.

Afin de diminuer le stress, les souris sont acclimatées dans la pièce de chirurgie au moins 1 h avant le début de la procédure. Les souris sont anesthésiées avec un mélange Xylazine-Kétamine avant le début de la procédure. Au cours de la chirurgie, les animaux sont placés sur une table chauffante (27-30°C) qui permet de réduire l'hypothermie. Les yeux seront protégés avec un lubrifiant aqueux. Les muqueuses sont observées pendant l'anesthésie, ainsi que la fréquence respiratoire. Au cours de la chirurgie, les participants vérifieront toutes les 15 min au moins, la profondeur de l'anesthésie par l'absence de reflexe de retrait suite au pincement des coussinets plantaires. La procédure est poursuivie uniquement quand l'animal est sous narcose profonde. De plus, les participants devront donc euthanasier la souris au maximum 2h00 après le début de l'anesthésie quel que soit la

procédure expérimentale. Une fois la procédure réalisée, pour éviter toute souffrance de l'animal à son réveil post-opératoire, la souris est euthanasiée par dislocation cervicale avant son réveil.

10607 La transmission synaptique rapide dans le cerveau des mammifères est classifiée en deux grandes familles : la transmission excitatrice, dont le neurotransmetteur le plus important est le glutamate, qui dépolarise la membrane cellulaire et favorise l'émission des potentiels d'action, et la transmission inhibitrice, dont les transmetteurs principaux sont le GABA et la glycine. La plupart des neurones du système nerveux central reçoit un barrage, variable dans le temps, d'excitation et d'inhibition dont la balance détermine le profil temporel des potentiels d'action et la transmission de l'information.

Quelles sont les règles qui déterminent comment inhibition et excitation interagissent au niveau de neurones individuels ? C'est une des questions-clé des neurosciences modernes et bien que plusieurs études aient essayé d'y répondre, beaucoup reste encore à savoir. Nous nous proposons d'étudier les règles d'intégration neuronale de la transmission excitatrice glutamatergique et de l'inhibition GABA/glycinergique dans deux régions cérébrales spécifiques, le thalamus et dans l'épithalamus, avec une attention particulière portée au rôle d'une sous-unité atypique des récepteurs au glutamate du type N-méthyl-D-aspartate (NMDA), la sous-unité GluN3A. Les régions du thalamus (les noyaux intralaminaires) et de l'épithalamus (l'habénule médiale) exprimant cette sous-unité sont impliquées dans le contrôle des cycles éveil-sommeil, et dans le développement et l'extinction des états émotionnels aversifs. L'élucidation des mécanismes synaptiques à la base de leur fonctionnement représente donc un but central dans la recherche actuelle en neurosciences.

Pour atteindre nos buts, il faudra obtenir des informations à plusieurs niveaux, de l'organisation morphologique des structures synaptiques, jusqu'à l'enregistrement de l'activité neuronale à la suite d'un barrage physiologique d'excitation et d'inhibition. Un ensemble de techniques sera donc utilisé pour disséquer le rapport entre excitation et inhibition : optogénétique, immunohistochimie, électrophysiologie, imagerie calcique, analyse du comportement in-vivo. En particulier, notre projet se basera largement sur les techniques d'optogénétique qui ont été récemment développées dans le domaine des neurosciences. L'optogénétique consiste dans l'expression de protéines sensibles à la lumière (Channelrhodopsine 2 et Halorhodopsine), dont la stimulation peut amener soit à l'excitation, soit à l'inhibition de populations neuronales spécifiques. Les stratégies utilisées pour obtenir l'expression spécifique de ces outils seront génétiques, et se basent donc sur l'existence et la disponibilité de modèles transgéniques. Les souris constituent en effet le seul mammifère aisément modifiable génétiquement. Les procédures utilisées, en particulier, comprendront des injections stéréotactiques de virus dans des souris anesthésiées, la préparation de tranches aiguës du cerveau, des tests comportementaux dans des animaux éveillés et des analyses morphologiques utilisant du tissu cérébral obtenu suivant perfusion intracardiaque. Pour notre projet, nous utiliserons des souris B6/C57 contrôles provenant de Janvier Laboratories, et plusieurs lignées de souris transgéniques exprimant la recombinase Cre (VGluT2-Cre ; Calrétinine-Cre ; récepteur nicotinique Beta4-Cre), et des souris KO pour la sous-unité GluN3A (GluN3Ako).

Comme l'on peut donc comprendre la souris sera le seul modèle animal utilisé pour nos études. Un modèle qui, à ce stade, ne peut pas être remplacé, mais seulement complété par des études sur des systèmes *in silico*. La réduction du nombre de souris sera possible dans le cas des analyses morphologiques puisqu'un seul animal fournit typiquement un nombre très élevé d'échantillons utilisables pour des buts différents, et dans le cas des expériences basées sur des manipulations optogénétiques in-vivo car chaque animal peut être soumis en parallèle à plusieurs tests.

La réalisation de ce projet se fera suivant les règles de bonnes pratiques d'expérimentation animale. Tout effort sera donc fait pour réduire, supprimer ou soulager au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux, en conformité à la règle des 3R, en particulier : 1) Réduction : le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides. L'utilisation de souris génétiquement modifiées qui présentent des propriétés bien calibrées, permet d'augmenter la précision des résultats et la portée des conclusions. De plus, nous exploitons au mieux nos élevages puisque nous étudions mâles e

t femelles. 2) Raffinement : les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux. Après toute intervention chirurgicale, les animaux seront surveillés et pesés quotidiennement jusqu'à reprise du poids normal et récupération d'un comportement normal. 3) Remplacement : les travaux utilisant des lignées cellulaires ou des animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes ; la souris est donc l'espèce la plus appropriée pour notre étude.

Ce projet de recherche nécessitera 1500 animaux.

10608 La lithiase rénale est un enjeu de santé publique car elle affecte 10% de la population. La plupart des calculs dépendent en grande partie de la concentration des urines en calcium. Un grand nombre de calculs rénaux se développent à partir de calcifications du tissu rénal nommées plaques de Randall. Des études cliniques récentes suggèrent que les apports importants en vitamine D augmentent la concentration du calcium urinaire chez certaines personnes prédisposées et pourraient être associées au développement de ces plaques mais il n'y a pas de preuve actuellement. Nous allons étudier l'influence de la vitamine D dans le développement de ces plaques à l'aide d'un modèle murin spécifique, le seul modèle de développement de plaques de Randall connu chez l'animal. Notre modèle et nos procédures expérimentales sont optimisés selon la règle des 3R (réduire, remplacer, raffiner). En effet, le modèle *in vivo* chez la souris est indispensable car il permet de générer des calcifications qui miment celles observées chez l'homme.

Les plaques de Randall étant constituées par des dépôts phosphocalciques, nous allons réaliser de l'imagerie *in vivo* par Tomographie à Emission de Positons (TEP) avec un traceur qui est le 18F-fluorure de sodium (FNa). Il se fixe dans le tissu osseux, se substituant aux groupements -OH au niveau des cristaux d'hydroxyapatite. Nous faisons l'hypothèse que cette imagerie TEP non invasive permettra de détecter les calcifications du tissu rénal chez les animaux stimulés par de la vitamine D. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum à savoir 4 groupes de 10 animaux soit 40 animaux au total (20 animaux génétiquement modifiés qui développent spontanément des plaques : 10 contrôles, 10 vitamine D et 20 animaux sauvages : 10 contrôles, 10 vitamine D. Dans le cadre du raffinement, aucune intervention invasive ne sera réalisée jusqu'à l'euthanasie. Il est attendu que la vitamine D favorise le développement des calcifications rénales. Les animaux seront observés quotidiennement et manipulés régulièrement pendant l'étude. Toutes ces procédures seront réalisées selon la règle des 3Rs, afin de limiter l'étude au nombre minimal d'animaux, en utilisant le seul modèle disponible de plaque de Randall disponible chez l'animal et en optimisant les procédures.

10609 Les maladies du système nerveux (Syndrome de Rett, sclérose latérale amyotrophique, Parkinson, Alzheimer, Huntington.) sont une préoccupation croissante en santé publique. De nouveaux outils diagnostiques associés à de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients.

Chez l'homme, le développement harmonieux du cerveau et de ses fonctions peut être affecté par un grand nombre de facteurs environnementaux et génétiques. Certaines de ces atteintes neurologiques vont conduire au développement de pathologies neurologiques plus ou moins sévères.

Le syndrome de Rett est une pathologie génétique dominante liée au chromosome X presque exclusivement de novo a une incidence de 1/15 000 naissances et représente la deuxième cause de déficience intellectuelle d'origine génétique chez les femmes en France et dans le monde (après la trisomie 21). Les patientes présentent un développement normal jusqu'à l'âge de 6 à 18 mois, puis commencent une phase de ralentissement du développement suivie d'une phase de régression qui amène à un état de polyhandicap très sévère.

Notre projet a pour but de développer une approche thérapeutique basée sur une thérapie génique qui consiste en l'administration d'un gène thérapeutique confidentiel (impliqué dans le métabolisme du cholestérol) au moyen d'un vecteur adéno-associé (AAV) par injection intraveineuse ou directement dans le cerveau. Le bénéfice thérapeutique attendu est une amélioration et surtout une

préservation des neurones de manière diffuse dans le cerveau et ainsi une amélioration des capacités motrices et cognitives.

Remplacement : Pour le réaliser, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle *in vitro* ou de culture cellulaire ne permet aujourd'hui d'étudier les symptômes de perte de la locomotion typique de cette maladie. De plus, la souris KO MECP2 est parfaitement bien caractérisée et reproduit la pathologie humaine.

Raffinement : Afin de limiter la douleur induite par les symptômes, nous n'étudierons que les premières étapes de l'apparition des symptômes et les animaux seront euthanasiés avant que la phase terminale de la maladie n'apparaisse pour le groupe malade non traités. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Réduction : Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de virus à injecter, les temps d'analyses. Ils ont également montré que l'étude de groupes de 12-15 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 246 souris réparties en trois groupes et deux types d'injections (intracérébrales ou intraveineux). De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux et la moelle épinière prélevés pour éviter des doublons des procédures expérimentales.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux.

10610 L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) est un cancer diagnostiqué tardivement et de mauvais pronostic (<5% de survie à 5 ans). Seuls les patients présentant une tumeur bien localisée (10 à 20%) bénéficient d'une intervention chirurgicale. Leur sélection est difficile, l'imagerie anatomique ayant une efficacité limitée pour la détection de l'invasion locale et des petites métastases. Une technique d'imagerie fonctionnelle sensible et spécifique, telle que la tomographie à émission de positons (TEP), permettrait une meilleure délimitation du tissu pathologique. Chez les patients opérés, les résections incomplètes laissant en place un reliquat microscopique présentent un risque de récurrence supérieur à 80%. Ceci est dû en partie à la difficulté d'évaluer les marges tumorales en per-opératoire. La chirurgie du cancer guidée par fluorescence (FGS), est une technique récemment introduite en clinique. Associée à une sonde fluorescente spécifique, elle permet d'identifier avec plus de précision l'extension locale de la tumeur et de ses métastases, invisibles à l'œil nu.

L'objectif de ce projet collaboratif est de développer à partir d'un peptide, un ensemble de sondes d'imagerie bimodales (Fluorescente et TEP) ciblant le récepteur de la neurotensine et de démontrer leur intérêt chez le petit animal atteint de cancer du pancréas. L'intérêt pour le patient serait double : radioactive la sonde permettrait de diagnostiquer et dresser le bilan d'extension de la maladie en TEP et fluorescente elle faciliterait la détection de la tumeur et de ses métastases lors d'une chirurgie intra-opératoire. La partie développement de la sonde pour l'imagerie TEP a déjà été autorisée par le comité d'éthique et plusieurs sondes bimodales ont été sélectionnées pour cette imagerie TEP. Nous estimons qu'il nous faudra utiliser environ 54 souris supplémentaires pour réaliser la partie imagerie et chirurgie de fluorescence qui aura lieu sur un autre site.

La règle des 3R a été envisagée lors de l'élaboration du projet. Le nombre d'animaux a été réduit, notamment par l'utilisation de l'imagerie non invasive pour suivre des modèles *in vivo* uniques parfaitement décrits dans la littérature (modèle de xénogreffe du cancer du pancréas en sous cutané ou en orthotopique). Tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, imagerie non invasive). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. Le modèle *in vivo* chez la souris est indispensable car il permet

d'avoir des résultats de pharmacocinétique dans tous les organes y compris la tumeur dans le but d'un transfert de la sonde chez l'homme.

10611 Projet :

EBP50 (aussi appelée NHERF1) est une protéine adaptatrice, située sous la membrane plasmique apicale, qui régule i/ des protéines de signalisation cellulaire impliquées dans la prolifération cellulaire et ii/ des transporteurs membranaires épithéliaux. Or les transporteurs sont essentiels à la fonction biliaire du foie. En effet une altération de ces transporteurs peut entraîner des pathologies hépatiques, telle que la cholestase qui évolue inéluctablement vers la fibrose et ensuite la cirrhose. C'est dans le foie que la protéine EBP50 a été retrouvée la plus exprimée, en particulier par les hépatocytes, principales cellules du foie et les cellules épithéliales biliaires. En parallèle d'étude *in vitro* sur des cultures cellulaires, nous proposons de réaliser des études *in vivo*, chez la souris invalidée pour le gène d'EBP50 (slc9a3r1). La protéine EBP50 est codée par le gène slc9a3r1. Pour cela, des souris invalidées pour EBP50 et leurs contrôles (souris dites « sauvages ») seront soumises à différents protocoles chirurgicaux pour étudier le rôle d'EBP50 au cours de la régénération hépatique et de la cholestase évoluant vers une fibrose hépatique.

Type d'animaux : Souris génétiquement modifiées invalidés pour EPB50 ou non sur fond C57BL/6j.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 608 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de ce projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu dans les pathologies hépatiques, telle que la cholestase qui évolue inéluctablement vers la fibrose et ensuite la cirrhose

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

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

10612 La résistance aux thérapies représente un enjeu majeur dans l'amélioration des thérapies conventionnelles et l'efficacité des nouvelles immunothérapies.

Notre programme de travail repose sur l'observation fondamentale que les cellules myéloïdes sont impliquées dans le développement tumoral et la résistance aux thérapies anti cancéreuses.

Ce programme de recherche implique des études *in vivo* reposant sur l'utilisation de différents modèles de souris transgéniques exprimant à la fois des rapporteurs de fluorescences diverses par les populations myéloïdes et ayant ou non des délétions génétiques totales ou conditionnelles pour certains récepteurs aux chimiokines. Les modèles tumoraux utilisés seront de deux types :

1) Utilisation de lignées tumorales injectées (lignées TC1 bioluminescente). Injection i.v. pour un modèle de tumeur du poumon (procédure 1) et sous labiale pour un modèle de tumeur tête et cou

(procédure 2). L'évolution tumorale dans ces deux cas est suivie 2 à 3 fois par semaine par bioluminescence.

2) Utilisation de modèle de souris transgéniques développant spontanément des tumeurs mammaires (Procédure 3). L'évolution tumorale est suivie par palpation régulière.

Dans ces différents contextes les animaux seront traités avec une combinaison thérapie conventionnelle et immunothérapies.

Radiothérapie locale (modèle tumeur tête et cou), Chimiothérapie (modèle tumeur du poumon) et ou sans immunothérapie avec anticorps monoclonaux.

Dans tous les cas les points limites fixés pour ces procédures sont fixés avant l'apparition de signes cliniques dommageables et le suivi régulier des animaux permet de prévenir au maximum une souffrance animale inutilement plus longue en euthanasiant les animaux ou en augmentant les conditions d'hébergements si cela est suffisant.

Les protocoles expérimentaux décrits ici font l'objet d'une demande de renouvellement d'autorisation d'un précédent projet valable jusqu'en décembre 2018. Les modifications liées aux changements expérimentaux et à l'évolution de la législation sont apportés dans cette demande

L'objet de cette saisine est donc de déclarer et présenter les différentes procédures expérimentales utilisées dans ce projet sur ces lignées afin d'obtenir leur autorisation.

Dans le cadre de ce projet les animaux utilisés seront issue de fournisseurs agréés ainsi que des stocks expérimentaux constitués au total de 2010 animaux.

Ce programme de recherche est développé dans le respect de la règle des 3R. Les élevages sont contrôlés au maximum pour ne pas générer de stocks expérimentaux excessifs. Il est tiré profit de chaque animal pour nous apporter le maximum d'information. Si possible, nous utilisons les données de manière transversale entre les protocoles afin de réduire le nombre d'animaux. Les groupes d'études sont fait le plus souvent en même temps afin de réduire le nombre de groupe contrôles. La production locale nous permet de réduire considérablement l'utilisation d'animaux issus d'éleveur privés. Le sujet reposant essentiellement sur des observations *in vivo* la notion de remplacement est la plus limitante dans le cadre de ce projet, cependant nous avons mis au point des expériences de cocultures *in vitro* des cellules tumorales avec des lignées de macrophages permettant d'analyser les interactions avec les cellules tumorales sans l'utilisation d'animaux. En plus des conditions d'hébergement et de suivi des animaux encadrés par le personnel compétant, certaines conditions de raffinement particulières seront utilisées telles que l'ajout de nourriture en poudre humide dans la cage pour le modèle tumeur tête et cou.

10613 Projet : Le but de cette étude est d'établir l'influence d'un facteur de transcription (Slug) sur la réponse à deux médicaments utilisés couramment dans le traitement des cancers colorectaux humain. Les différents modèles cellulaires (parentale ou ayant une augmentation du gène SLUG) seront injectés à des souris ayant perdu leur système immunitaire. Ces cellules ainsi greffées, vont développer une tumeur à l'emplacement de l'injection.

Nous avons choisi le modèle des souris nude car c'est le modèle le plus adapté pour ce genre d'étude, ces souris étant immuno-déficiente, elles ne rejettent pas les cellules humaines qui leur seront injectées.

Ces souris recevront quelques jours après l'injection des cellules tumorales, des traitements de médicament (Aflibercept ou Bevacizumab) et nous suivrons la croissance tumorale au cours du temps et ainsi évaluer l'efficacité de ce médicament sur les différents modèles.

A la fin de l'étude expérimentale, les animaux seront euthanasiés, les tumeurs prélevées pour poursuivre nos recherches sur l'action de nos médicaments au niveau des voies de signalisation au sein des tumeurs prélevées.

Nous mettons tout en œuvre pour respecter la règle des 3R : Réduction, Raffinement, Remplacement, en n'utilisant que la quantité minimale de souris pour avoir en final des résultats statistiquement satisfaisants (réduction). Les bonnes pratiques et les règles éthiques sont toujours respectés au cours de notre protocole et veillons à surveiller les points limites que nous nous

sommes fixés (raffinement). Enfin, l'ensemble des études présentées ici ont préalablement été menées *in vitro*, cependant ces études doivent également être étudiées *in vivo* dans lequel l'environnement de la tumeur est ici pris en compte, ce qui n'est pas envisageable dans une boîte de culture cellulaire (remplacement).

Nous nous attendons à ce que les clones ayant une augmentation de l'expression du gène SLUG aient une réponse aux deux médicaments similaires aux cellules parentales, ce qui confirmerait que ses deux traitements peuvent être utilisés chez les patients surexprimant ce gène.

Type d'animaux : Souris immunodéficientes (NMRI-Nude Foxn1)

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 144 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Les études *in-vitro* déjà menées ont permis de sélectionner/affiner au mieux les conditions expérimentales du projet afin de réduire au maximum le nombre d'animaux impliqués dans cette étude. En effet, cette étude ne peut être conduite qu'*in vivo* car celle-ci prend en considération la tumeur, son environnement ainsi que l'ensemble des interactions mise en jeu. Ainsi, il n'y a pas de modèles alternatifs au modèle animal permettant de recréer l'ensemble des acteurs impliqués dans le développement tumoral et l'action des traitements proposés. »

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. De précédentes études déjà effectuées nous permettent de savoir le nombre de cellules à injecter afin de réduire le nombre d'animaux.

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

10614 Le diabète est une maladie qui touche environ 350 millions de personnes dans le monde. Il existe principalement deux types de diabète : le diabète de type 1 et celui de type 2. Le diabète de type 2 est plus fréquent, touchant plus d'un million et demi de personnes en France et ne cesse d'augmenter. Il représente ainsi environ 85 % de l'ensemble des diabètes. Cette maladie métabolique est caractérisée par un excès chronique de sucre dans le sang (hyperglycémie) et s'accompagne souvent d'un surpoids. D'après nos études récentes chez l'homme, des anomalies apparaissent sur certaines populations de cellules du système immunitaire chez les patients diabétiques.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier ces populations de cellules et leurs rôles dans le diabète de type 2, notamment grâce à différents modèles animaux. Effectivement, il est nécessaire d'utiliser le modèle animal afin de comprendre les interactions entre les différents organes et les mécanismes développés par l'organisme au cours de la maladie.

Pour étudier ce diabète de type 2, nous utilisons plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées dont le phénotype n'est pas dommageable. Ces souris sont nourries avec un régime hyperlipidique pendant trois à quatre mois et la prise de poids est suivie régulièrement par pesée. Nous maintenons nos lignées en élevage interne en prenant soin de produire le nombre minimum d'animaux nécessaires au maintien de ces lignées et aux expérimentations. Nous ferons l'analyse des organes cibles sur certains animaux et sur d'autres nous procéderons à des tests métaboliques

après une mise sous régime alimentaire gras. Une autre procédure permettra d'induire un diabète accéléré à certaines souris et d'étudier les organes cibles des cellules du système immunitaire.

Ce projet prévu pour 5 ans nécessitera au total 872 souris. Toutes les procédures expérimentales ont été élaborées de manière à respecter le principe des 3R, tout en obtenant des résultats avec des analyses statistiques satisfaisantes. Pour chacune de ces procédures, le bien-être des animaux est surveillé, de l'enrichissement est ajouté dans leurs cages. Une visite quotidienne des animaux sera effectuée pour vérifier leur état général et ne pas atteindre un des points limites.

Ce projet permettra de mieux comprendre les interactions et les rôles des cellules du système immunitaire dans le diabète de type 2 dans les organes cibles afin de pouvoir par la suite, élaborer une thérapie efficace et moins contraignante pour les patients.

10615 La douleur neuropathique induite par des lésions du système nerveux périphérique altère considérablement la qualité de vie des patients. Ces douleurs peuvent survenir à la suite de lésion secondaire (diabète, effet secondaire dû à un traitement) ou traumatiques (sections d'un nerf). Ces douleurs se traduisent majoritairement par une allodynie (douleur induite par un stimulus normalement non douloureux) induite par le froid ou le toucher. Sur le plan pharmacologique, la douleur neuropathique répond mal aux antalgiques classiques (Gapabentine et Morphine).

Nous souhaitons mettre au point un modèle de douleur neuropathique cliniquement pertinent pour évaluer les propriétés antalgiques de nouvelles molécules provenant de l'industrie pharmaceutique sur ce type de douleur. Les études d'efficacité antalgique sont exclusivement réalisées chez le rat, offrant des mesures robustes et reproductibles sur la base de modèles parfaitement décrits, calibrés et admis par la communauté scientifique.

Nos activités s'inscrivent dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Si des méthodes alternatives existent lors des phases précoces de développement d'une molécule (modélisation informatique, ingénierie tissulaire, cellules souches), l'avancement de la caractérisation de la molécule d'intérêt ne permet pas à l'heure actuelle de remplacer l'étude de son efficacité chez l'animal vigile. Les progrès méthodologiques et technologiques couplés aux avancées de la connaissance scientifique permettent d'une part de raffiner les modèles animaux existants et d'autre part de développer et proposer des modèles *in vivo* toujours plus proches des situations cliniques (induction de pathologies, mesures des composantes multiples de la douleur). Le raffinement passe également par la réduction autant que possible de la souffrance et du stress des animaux et l'amélioration de leur bien-être. Les expérimentateurs sont formés au respect de l'animal, aux gestes techniques pratiqués sur celui-ci ainsi qu'à leur surveillance poussée. Toute chirurgie sera pratiquée sous anesthésie générale. Enfin, pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Dans le cadre de ce projet, une estimation montre que le nombre d'animaux qui seront utilisés pour la totalité du projet (1 an) est de 510 rats répartis dans 5 procédures.

L'objectif des études réalisées est de fournir des résultats scientifiques, générés dans le respect systématique des normes éthiques les plus élevées, sur l'intérêt de molécules antalgiques destinées au traitement de diverses pathologies douloureuses chez le patient.

10616 La maladie de Parkinson est l'une des maladies neurodégénératives les plus courantes qui touche rien qu'en France plus de 150 000 personnes de plus de 65 ans. Les patients parkinsoniens souffrent de dysfonctionnements cognitifs mais aussi de déficits moteurs en particulier des difficultés d'apprentissage moteurs.

On sait que cette maladie se caractérise par la perte des neurones qui synthétisent la dopamine. Ces neurones composent deux régions du cerveau, la substance noire compacte et aire tegmentale ventrale et ils communiquent avec d'autres régions du cerveau, comme le cortex moteur primaire. Cette région participe à l'apprentissage de mouvements complexes et dépendent de l'action de la dopamine. Beaucoup de données anatomiques ont été recueillies sur la voie de communication entre les régions à dopamine et le cortex mais son importance fonctionnelle est encore méconnue

car on ne sait pas comment agit la dopamine sur les neurones du cortex moteur. On sait qu'il est composé de deux populations neuronales majoritaires, qui interagissent entre elles.

Dans ce projet, nous souhaitons étudier l'action de la dopamine sur ces deux populations neuronales chez la souris au cours d'une tâche de préhension de nourriture qui est une tâche motrice sophistiquée nécessitant un apprentissage et ceci en condition normale et en condition pathologique dans un modèle murin mimant la maladie de Parkinson. Ce modèle est obtenu en injectant par stéréotaxie une neurotoxine, la 6OHDA dans le cortex de souris qui va détruire spécifiquement les projections des neurones à dopamine. Cela nous permettra d'étudier le rôle joué par la dopamine dans cet apprentissage en étudiant le réseau cortical en conditions "parkinsoniennes ». Les animaux contrôles recevront une solution saline.

Pour étudier la physiologie des neurones du cortex, nous utiliserons une approche récente, l'optogénétique permettant de modifier l'activité des neurones grâce à des protéines sensibles à la lumière. Ces protéines produites normalement dans des algues, seront rapportées dans le cerveau au cours de la même chirurgie stéréotaxique par injection de vecteurs permettant l'expression de ces protéines sensibles à la lumière. Nous utiliserons des souris transgéniques, qui ne montrent aucun phénotype nocif, mais qui permettent de « manipuler » les propriétés électrophysiologiques des neurones du cortex.

Dans l'état des connaissances, il n'est pas possible pour l'instant de réaliser ce projet sans avoir recours à des cerveaux entiers dans lesquels les neurones communiquent entre eux. Les modèles *in vitro* ne peuvent pas pour l'heure reproduire la complexité de l'organisation du cerveau souris. De même, les modèles informatiques ne sont pas encore assez puissants pour mimer des réseaux neuronaux complexes en fonctionnement. Nous avons donc encore besoin d'utiliser des animaux vivants.

Après récupération de cette chirurgie stéréotaxique, les animaux seront soumis à l'apprentissage d'une tâche de préhension de nourriture placée dans une fente qui nécessite une bonne motricité des membres antérieurs. Les capacités d'apprentissage seront évaluées chez les animaux « parkinsoniens » et les animaux contrôles. Après l'euthanasie, le cerveau des animaux sera prélevé pour des études électrophysiologiques sur tranches, pour établir un lien entre troubles moteurs et la physiologie des neurones du cortex en conditions normale et pathologique.

Dans le respect du R de réduire, nous avons dessiné la stratégie expérimentale de manière séquentielle en utilisant les modèles transgéniques de façon successive en vérifiant nos hypothèses à chaque étape. Le nombre de 20 animaux par groupes expérimentaux et leur contrôle a été défini pour obtenir des statistiques fiables avec le plus petit nombre d'animaux possibles. Le projet utilisera au total 546 souris. Dans le respect du R de raffiner, les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'analgésiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures pour soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, et au cours des étapes de l'apprentissage, et accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Pour cela, les chirurgies stéréotaxiques se feront sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès leur réveil et qui sera maintenue tant que l'animal montre des signes de souffrance. Au cours des étapes de l'apprentissage, les animaux sont légèrement restreints alimentaires, une surveillance accrue de leur poids et de leur état général et un accès immédiat à la nourriture au constat d'un mal être. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

10617 Dans le cadre d'une nouvelle offre de formation de Master en Biologie-Santé un parcours spécifique en Neurosciences sera proposé à la prochaine rentrée universitaire. L'objectif principal de ce parcours est de fournir une base de connaissances larges et solides permettant d'appréhender la complémentarité des différents niveaux d'analyse des Neurosciences du niveau fondamental vers

celui de la clinique, ainsi qu'un savoir-faire technique et une compétence pratique de l'organisation d'un travail de recherche.

Dans ce cadre, cette demande d'autorisation pour l'utilisation d'animaux concerne les travaux pratiques (TP) prévus pour des étudiants de Master 1 ayant choisi la spécialité Neurosciences. Ces TP s'adossent à des cours et travaux dirigés durant lesquels les étudiants auront acquis des connaissances sur le développement et l'anatomie du cerveau et notamment le développement des connexions inter-neuronales chez l'Homme et chez la souris. Ce TP vient donc en application de ces cours afin de mettre en évidence les voies neuronales assurant plus particulièrement la motricité chez la souris. L'approche couramment utilisée est l'injection dans une structure cérébrale d'un traceur qui pénètre dans les neurones de la première structure et permet ainsi de visualiser la ou les structure(s) qu'ils contactent.

Ces TP auront donc pour but de mettre en évidence les connexions entre les neurones du cortex moteur d'une part et les structures cérébrales et la moelle épinière d'autre part. Au travers de ces TP, les étudiants acquerront des compétences techniques et théoriques de base en neurophysiologie : injection stéréotaxique, préparation de tissus et neuroanatomie. Lors de ces TP, nous sensibiliserons également les étudiants aux questions éthiques soulevées par l'expérimentation animale. La règle des 3R sera appliquée : la méthodologie sera raffinée : prise en considération de points limites : variation de poids, signes cliniques et comportementaux. La douleur, la souffrance et/ou l'angoisse des animaux seront réduites grâce à l'administration de produits anesthésiants et/ou analgésiants. L'hypothermie des animaux sera limitée par l'utilisation d'une couverture chauffante et la température corporelle de l'animal sera contrôlée par sonde rectale pendant la chirurgie. Le modèle animal sera utilisé car il ne peut être remplacé dans cette étude puisque le principe est précisément d'observer la mise en place des connexions neuronales dans le cerveau entier. Enfin, la réduction du nombre d'animaux utilisés sera appliquée : chaque souris sera utilisée par 4 ou 5 étudiants. Nous utiliserons donc 4 souris par groupe de 18 étudiants plus 1 souris pour la démonstration. Compte tenu du nombre d'étudiants dans la formation (36 étudiants par an, soit 2 groupes de 18 étudiants), pour réaliser ces travaux pratiques, nous utiliserons 10 souris par an soit 40 souris pour la totalité du projet (4 ans).

10618 Depuis peu, l'influence de la nutrition sur l'activité veille/sommeil est étudiée, comme hypothèse innovante et originale. Des données cliniques suggèrent que la consommation de l'acide docosahexaénoïque (DHA), le principal omega-3 du cerveau, est essentielle pour maintenir la qualité et la quantité de sommeil mais les études disponibles restent limitées à ce jour. Notre projet vise à étudier les conséquences d'une variation des taux cérébraux de DHA sur la qualité et la quantité de sommeil chez la souris, par une approche nutritionnelle adaptée. Les animaux seront issus de mères nourries avec un régime déficient ou supplémenté avec le précurseur du DHA (l'acide alpha-linolénique ou ALA) au cours de la période périnatale. Ils seront ensuite maintenus sur le même régime que leur mère jusqu'à l'âge adulte. Il a été montré que cela induisait des changements significatifs de la composition en DHA du cerveau des souris. Nous enregistrerons l'activité veille/sommeil par électroencéphalographie (EEG) couplée à de l'électromyographie (EMG) et nous quantifierons le temps passé dans les différentes phases de sommeil et d'éveil ainsi que la qualité du sommeil (analyse de l'amplitude des oscillations corticales). Dans une deuxième série d'expériences, nous étudierons la capacité des animaux à s'adapter à une insomnie transitoire.

Ce travail sera le point de départ pour l'identification des mécanismes impliqués et à plus long terme pour développer des stratégies nutritionnelles et/ou pharmacologiques pour améliorer le sommeil chez les individus atteints de troubles.

Nombre total d'animaux utilisés : 60.

Pour toutes les procédures expérimentales, nous avons calculé le nombre minimal de souris requis afin d'aboutir à des données analysables par méthodes statistiques classiques. Nous ne pouvons remplacer les animaux par d'autres techniques. Nous prenons enfin en compte le bien-être des

animaux via l'enrichissement des cages, la stabulation en cages collectives, la prise en charge de la douleur si nécessaire et l'euthanasie des animaux si les points limites sont dépassés.

Respect de la règle des 3Rs :

Règle des 3Rs :

« Remplacer » : L'étude des régimes alimentaires nécessite l'utilisation d'animaux vivants. De même, le sommeil ne peut être étudié que sur des animaux vivants et vigiles.

Pour se faire, nous utilisons des tests *in vivo*, et dans ce contexte, le recours à des modèles animaux pertinents et adaptés aux études *in vivo* reste donc une nécessité expérimentale afin d'appréhender la réalité physiologique de nos résultats. Une recherche d'alternatives et d'autres méthodes dans des bases de données démontre que les solutions de rechange appropriées à ces procédures ne sont pas disponibles, et qu'aucun duplicata du travail proposé n'est aujourd'hui identifié.

« Réduire » : Nous avons choisi d'utiliser le minimum d'animaux par condition expérimentale avec les contrôles appropriés comme cela est classiquement réalisé, afin d'avoir des données analysables par méthodes statistiques classiques.

« Raffiner » : Les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures, soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupe sociaux le plus longtemps possible. Ils auront à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après les différentes expérimentations. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

Concernant les mesures mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales :

Les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane par une induction de 4 min à 4% d'isoflurane /1,5l d'air /min) et sont ensuite maintenus anesthésiés au masque avec 1% d'isoflurane /0,4 l d'air/minute). La température corporelle de l'animal est maintenue constante à 37°C par la présence d'une couverture chauffante placée sous l'animal. Lacrigel (gel protecteur) sera appliqué sur les yeux de la souris pour éviter tout dessèchement. Au niveau du site de l'incision, nous appliquerons de la lidocaïne à 4% (anesthésique local).

Les animaux reçoivent une injection sous cutanée de 100µl de Buprecare (0.1mg/kg) 30 minutes avant la chirurgie. Si le lendemain, l'animal manifeste des signes de souffrance (manque de mobilité, isolement, pelage piqué), il recevra une nouvelle dose.

En fin de procédure, les animaux sont surveillés durant deux heures par l'expérimentateur. Il sera vérifié que les animaux ont repris leur alimentation et se sont hydratés. Sinon, les animaux recevront une injection de 0,5ml de NaCl 0,9% en IP. Les jours suivants si les animaux manifestent un problème de santé une prise de décision d'euthanasie est faite par l'expérimentateur. Après cette période critique, les animaux sont surveillés quotidiennement. Les implants sont surveillés chaque jour, afin de vérifier qu'ils ne sont pas abimés ou arrachés.

10619 L'insuffisance sphinctérienne est une cause d'incontinence urinaire d'effort. Elle est rencontrée le plus souvent chez la femme en contexte de lésion sévère post-obstétricale ou chez la femme âgée dans un contexte multifactoriel. Chez l'homme, elle survient principalement comme complication de la chirurgie du cancer de la prostate ou de la vessie. Les causes de traumatismes (traumatisme de la moelle par exemple) sont également présentes pour les deux sexes. Ces symptômes urogénitaux peuvent avoir un retentissement significatif sur la qualité de vie de ces patients. La rééducation périnéale est le traitement de première intention dans les deux sexes. Chez la femme ménopausée, l'hormonothérapie locale est un adjuvant utile. En cas d'échec ou d'efficacité incomplète, le traitement de l'insuffisance sphinctérienne est chirurgical. Certains protocoles tentent

de mettre en place la reconstruction du sphincter avec un succès limité chez l'homme. C'est pour cela que la recherche de nouveaux traitements est essentielle. Le but de ce projet est d'avoir un modèle chez le rat qui nous permette de mettre en évidence les effets d'un candidat médicament sur le mécanisme de fermeture de l'urètre et sur un modèle pathologique d'insuffisance sphinctérienne.

Les études réalisées le seront suivant le profil suivant :

- étude des effets sur le mécanisme de fermeture de l'urètre
- étude des effets sur un modèle d'incontinence à l'effort par déficience sphinctérienne (cautérisation de l'urètre) chez le rat anesthésié. L'insuffisance sphinctérienne sera évaluée entre 2 et 16 semaines post induction avant et après administration du candidat médicament. A la fin des expérimentations, les animaux seront euthanasiés suivant les recommandations. Actuellement, les méthodes alternatives permettant une évaluation de la fonction vésicale, sont inexistantes. De ce fait, le recours à l'expérimentation animale reste incontournable.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit auprès des animaux (bâtons à ronger, tunnels). Durant toute la période d'expérimentation, un contrôle quotidien sera réalisé afin de s'assurer de l'état général des animaux et de détecter des comportements atypiques suite aux éventuels effets secondaires des traitements :

- altération des fonctions normales,
- tremblements, anomalies,
- perte de poids > 20% du poids initial,
- posture anormale.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 1600 rats en raison de 10 rats inclus par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

10620 De nos jours l'épilepsie concerne 50 millions de personnes dans le monde dont environ un quart ne sont pas contrôlés par le traitement médical. Les thérapeutiques invasives actuelles prévoient une ablation du foyer épileptogène par voie chirurgicale lorsque celui-ci a pu être clairement mis en évidence. Aux états unis, on estime à environ 6% la proportion de patients épileptiques qui ont eu recours à la chirurgie entre 2004 et 2009. Seulement 50% de ces patients seront guéris à 10 ans.

L'essor des techniques mini invasives et médecine et en chirurgie a bouleversé la pratique au cours des 25 dernières années. En neurosciences, l'essor rapide de la neuroradiologie interventionnelle a été rendu possible grâce à de nombreux dispositifs endovasculaires permettant de placer sous contrôle scopique direct du matériel (coils ou stent) ou d'injecter un agent embolique liquide. Dans cette dernière catégorie, on dénombre trois agents sur le marché ; le plus ancien étant la colle ou cyanoacrylate (Glubran®), le plus répandu étant l'Onyx © (Ethylène vinyl alcool polymère) et le plus récent le Phil©. Ces substances sont actuellement utilisées pour l'occlusion de shunt artérioveineux cérébraux ou périphériques. A l'heure actuelle, il n'existe pas de cas rapporté dans la littérature d'ablation tissulaire par ischémie dirigée avec ces agents.

Le but du présent protocole est d'étudier les remaniements inflammatoires post ischémie cérébrale induite par l'injection intra artérielle d'Onyx chez le rat.

Cette étude *in vivo* nécessitera une mise au point préalable, pour optimiser les gestes à réaliser, et ainsi réduire le nombre d'animaux pour chaque groupe. C'est le rat Sprague-Dawley qui a été choisi comme modèle. Un total de 50 animaux est prévu soit 5 groupes de 10, permettant ainsi la phase de mise au point, puis la comparaison de 4 groupes après l'induction de l'ischémie.

Dans le cadre de ce projet, tout sera mis en œuvre pour respecter au mieux la règle des 3R :

(Remplacer) Il s'agit d'une étude basée sur une analyse histologique témoignant de remaniements inflammatoires. Il n'existe pas de méthode alternative permettant de reproduire les réactions d'un organisme entier face à de multiples interactions biologiques simultanées.

(Réduire) Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum, en considérant toutefois un nombre suffisant permettant d'observer une différence significative entre les groupes.

(Raffiner) La souffrance et l'angoisse de l'animal seront prévenues par la réalisation d'une anesthésie générale pendant toute la durée du protocole. Une étude des comportements sera réalisée en post opératoire avec adjonction, si besoin, d'antalgiques. Le protocole portant sur la réalisation d'un infarctus cérébral expérimental (indolore chez l'homme), on ne prévoit pas de douleur particulière en dehors de la ponction carotidienne initiale. Une euthanasie précoce sera décidée en cas d'apparition de signes de souffrance animale. Le personnel impliqué est sous la responsabilité du porteur de projet formé à l'expérimentation animale ("Conception et réalisation des procédures expérimentales") et sera assisté par une personne du plateau technique qui a l'expérience du travail sur rongeurs et ayant suivi une formation à la chirurgie expérimentale.

10621 Les macrophages sont des composant cellulaire du système immunitaire inné. Ils résident dans tous les tissus des vertébrés y compris ceux de l'Homme où ils contribuent à l'immunité, la réparation et l'homéostasie tissulaire.

Historiquement, les macrophages sont considérés comme étant des cellules à durée de vie courte qui sont continuellement remplacés par de nouvelles cellules produites par la cellule souche hématopoïétique (CSH) présentes dans la moelle osseuse. Bien que ce mode de production se produise, principalement dans des conditions inflammatoires, il n'est pas majoritaire et des données récentes de la littérature démontrent que les macrophages tissulaires proviennent de progéniteurs embryonnaires, provenant du sac vitellin et/ou du foie embryonnaire, qui vont se développer dans les différents organes et y rester à l'âge adulte en proliférant localement. Puisqu'ils ont une durée de vie longue et que le stock est maintenu dans le tissu grâce à la prolifération locale, les macrophages sont eux aussi soumis au vieillissement et nous avons montré récemment que les capacités de prolifération des macrophages tissulaires diminuent avec l'âge.

Par ailleurs, en dehors d'être des acteurs centraux de la réponse immunitaire innée, les macrophages sont aussi impliqués dans des processus de régénération. Ils sont par exemple nécessaires à la remarquable capacité des vertébrés inférieurs, tels que des salamandres et des poissons, de guérir des blessures sans cicatrice et de régénérer des parties complexes du corps telles que les membres. Bien que les capacités de régénération des mammifères soient plus limitées, la régénération de certains organes tels que le muscle, le foie et le cœur chez le nouveau-né, est aussi dépendante des macrophages. De manière intéressante, nous avons récemment observé que les macrophages cardiaques résidents ainsi que les macrophages alvéolaires (ceux des alvéoles pulmonaires) ont un taux de prolifération qui diminue drastiquement avec l'âge et cette perte de prolifération est corrélée avec la perte de capacité de régénération du muscle cardiaque ou de la fonction pulmonaire.

Sur la base de ces observations, il devient central de comprendre si le vieillissement, ou ses conséquences moléculaires, peut être inversé afin de « relancer » la prolifération locale et ainsi retrouver de meilleures fonctions immunitaires et régénératives des macrophages chez les personnes âgées.

Ainsi, nous souhaitons analyser les mécanismes moléculaires contrôlant la fonction et la prolifération des populations de macrophages tissulaires de différentes origines ontogénétiques dans différents contextes inflammatoires ou d'historiques de prolifération. Nous étudierons principalement les macrophages cardiaques, alvéolaires, les microglies, les macrophages testiculaires, du foie, de la rate, de la moelle osseuse, du muscle et du péritoine. Les macrophages sont connus pour être d'origine embryonnaire dans un premier temps et pour certaines populations de macrophages en fonction des organes ou tissus, peuvent être remplacés par des macrophages d'origine de la moelle osseuse. Généralement pour étudier l'origine des macrophages provenant de la moelle osseuse, il est réalisé des transplantations de cellules de la moelle osseuse dans des

souris dépourvus de cellules hématopoïétiques par irradiation. Cette technique induit énormément de stress chez l'animal, et l'irradiation provoque de l'inflammation chez l'animal qui va être transplanté. Pour éviter cette méthode, nous avons mis au point une technique d'injection de moelle osseuse (provenant d'une souris ayant par exemple un transgène Tomato ou GFP ou CD45.1/CD45.2) dans le foie du nouveau-né. En effet l'hématopoïèse fœtal est encore en place dans le foie pendant les 2 premiers jours de vie de la souris et la transition des cellules souches du foie à la moelle osseuse pour donner l'hématopoïèse définitive se fait pendant cette période. Ainsi les cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle injectée vont migrer du foie à la moelle osseuse et donner ainsi la progénie myéloïde que nous pourrions visualiser et suivre grâce au reporter fluorescent dans les différents organes décrit plus haut. Cette technique de traçage cellulaire inédite permet de visualiser l'ontogénie des macrophages tissulaire provenant de la moelle osseuse, dans des conditions d'homéostasie, sans induire du stress et de l'inflammation chez la souris.

Justification du nombre d'animaux à transplanter : ces estimations se font en fonction du nombre de portées que nous estimons sur ces 5 prochaines années. En estimant 4 accouplements par lignée, avec 2 femelles par accouplements soit au total 8 femelles par lignée. En comptant une gestation par mois pour chacune des femelles, cela fait sur un an, 96 portées par lignée. Si nous comptons en moyenne 6 nouveau-nés par portée, cela fait donc au total 576 nouveau-nés par lignée. 576 X 4 lignées, cela fait un total de 2304 nouveau-nés à transplanter sur 5 ans portant sur ce projet ontogénie.

Dans l'impossibilité d'obtenir des échantillons de macrophages de différents tissus humains (nécessitant des prélèvements invasifs), l'utilisation de modèles animaux est indispensable. Ne pouvant donc pas remplacer le modèle murin, nous réduirons autant que possible leur utilisation. Ainsi pour chaque expérimentation, les macrophages de plusieurs tissus seront analysés et répartis entre les différents membres de l'équipe pour une analyse aussi complète que possible de chaque lot d'animaux.

Durant l'ensemble de l'étude, les souris seront hébergées dans des conditions conformes à la réglementation européenne en vigueur (environnement contrôlé : température et ventilation régulées, lumière avec un cycle de 12h, hygrométrie), avec un accès continu à la nourriture et à l'eau. Les souris seront maintenues en groupes de 3 à 6 animaux par cage. L'environnement est enrichi par des dômes en carton ou du coton. La surveillance journalière des animaux en expérimentation nous permet de définir un point limite selon les signes extérieurs de souffrance : léthargie, poil hérissé, comportement asocial, dos courbé, animal se déplaçant difficilement, perte de poids supérieur à 20% de son poids initial : L'atteinte d'un de ces points limites entraînera la décision d'euthanasie des animaux concernés.

10622 Les laboratoires de recherche privés ou académiques comptent dans leurs rangs de nombreux personnels qui interviennent directement dans la mise en œuvre de projets scientifiques utilisant des animaux vivants. Ces projets ont pour but d'améliorer à la fois nos connaissances mais aussi la santé humaine ou animale. L'objectif de ce projet, intégré dans une formation agréée chirurgie selon les principes de la directive 2010/63/UE et du décret du 1er février 2013 sur l'expérimentation animale, est d'assurer les compétences des agents pratiquant ou concevant des procédures chirurgicales sur animaux vivants, sur la base de travaux pratiques (TP) chez le rat adulte (Sprague Dawley mâle ou femelle). L'originalité de cette formation réside dans le recours aux techniques de télémétrie et d'imagerie *in vivo* comme techniques d'assistance à la chirurgie. Du fait des requis pour la formation, aucune méthode alternative non-animale n'est ici adaptée. Les personnels seront formés, lors d'un 1er TP (durée 3h) sur rats anesthésiés, aux techniques de base de canulations vasculaires (veine jugulaire et artère carotide). Un second TP (3h) consistera en une expérimentation de télémétrie, pour le suivi de la pression artérielle chez le rat. Un troisième TP (3h) de démonstration, proposera une exérèse de mélanome chez la souris, assistée par imagerie optique. Sur la base de l'expérience des années passées et en conformité à la règle des 3R, le nombre des TP réalisés ainsi que le nombre d'animaux par TP sont limités à la quantité minimale suffisante pour atteindre les objectifs : par an 1 session de formation pour 9 personnels au maximum

est organisée. Les TP nécessitent 9 rats/ TP, soit 18 rats pour les 2 séances et 2 souris pour le 3ème TP. Le nombre total d'animaux pour mener à bien ces objectifs est donc estimé à 90 rats et 10 souris sur 5 ans. L'animalier observera quotidiennement le comportement général de l'animal, son apparence et contrôlera la présence d'eau et de nourriture pour chaque cage. Toute observation anormale sera transmise à l'enseignant/expérimentateur et noté dans un tableau des points limites

10623 Une grande variabilité de réponses au gavage chez les canards existe aujourd'hui. Identifier des biomarqueurs de l'aptitude à la production de foie gras permettrait donc de sélectionner les animaux les plus adaptés au gavage mais aussi d'euthanasier plus tôt les animaux avec un foie gras suffisamment développé. Dans une étude préliminaire nous avons observé que la quantité dans le sang d'une protéine appelée chemerine augmentait fortement au cours du gavage chez le canard de race Barbarie et ainsi pourrait être un bon marqueur de l'engraissement du foie chez le canard. Nous avons aussi observé que la surface du foie sortant de la cage thoracique déterminée par échographie pourrait être aussi un bon indicateur du développement du foie. Tous ces résultats sont très prometteurs mais ont besoin d'être validé d'une part chez la race Mulard la plus répandue dans les fermes et d'autre part sur un plus grand nombre d'animaux avec des gavages d'intensités différentes afin d'obtenir des poids variables de foie. Pour répondre à ces objectifs 125 canards mâle de race Mulard seront utilisés. La règle des 3 R sera respectée : Réduction : le nombre d'animaux mis en élevage puis gavage prend en compte les besoins expérimentaux, la mortalité éventuelle et la variabilité de réponse au gavage. Le gavage des animaux est maîtrisé par l'unité expérimentale, ce qui permet de limiter les étapes de mises au point. Remplacement : le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*. Raffinement : les canards seront élevés en conditions standards et feront l'objet d'une surveillance quotidienne. La procédure (prise de sang) sera réalisée de manière à limiter la souffrance des animaux. Tous les symptômes comportementaux persistants définis par un point limite entraîneront le retrait de l'animal de l'expérimentation.

10624 Le cancer colorectal, très fréquent dans les pays industrialisés, se place au 3ème rang des tumeurs les plus fréquentes chez l'homme et au 2ème rang chez la femme, mais il se situe surtout à la deuxième place en terme de mortalité après le cancer du poumon. Ce cancer se développe à partir des cellules souches intestinales tumorales, qui sont capables de s'auto-renouveler et vont donner naissance aux différents types cellulaires qui constituent la masse tumorale. Ces cellules souches tumorales doivent être éradiquées afin d'obtenir la rémission complète du patient. Toutefois, il s'avère que ces cellules sont résistantes aux thérapies conventionnelles et seraient à l'origine de l'apparition de métastases et de la récurrence tumorale.

L'objet de ce projet de recherche est de mieux comprendre la biologie des cellules souches intestinales tumorales et de proposer, à terme, de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement les cellules souches tumorales. Pour cela, nous utiliserons une approche de physiologie intégrée à l'aide de modèles de souris transgéniques qui récapitulent fidèlement la pathologie du cancer colorectal chez l'homme. Ces modèles permettent d'étudier les phases précoces du cancer. Certaines expériences seront également menées chez la souris immunodéprimée nude athymique qui est un modèle classique pour étudier l'initiation tumorale de cellules cancéreuses ainsi que la réponse aux thérapies anti-cancéreuses.

Pour ce projet, nous utiliserons 174 souris, sur une durée totale de projet de 5 années. Notre démarche s'inscrit dans le respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 (« règle des 3R ») : 1/ Remplacement : nos études nécessitent une approche de physiologie intégrée, cependant, dans la mesure du possible, la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires fera appel à des cultures organotypiques primaires d'épithélium intestinal dérivées des différents modèles murins afin de remplacer et limiter le nombre d'animaux utilisés ; 2/ Réduction : le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et les élevages seront utilisés au mieux puisque les études seront menées sur des mâles et femelles, et la majorité des génotypes produits seront utilisés ; 3/ Raffinement : les animaux feront l'objet d'une surveillance régulière par les

expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Afin de réduire au maximum la douleur et l'angoisse que certains protocoles pourraient engendrer chez les animaux, des points limites ont été définis. Tous les animaux auront à leur disposition de la boisson et de la nourriture à volonté, et leur milieu sera enrichi à l'aide de carrés de coton pour la construction d'un nid, ainsi que de litière mélangée à des copeaux.

10625 Les pathologies broncho-pulmonaires représentent une cause majeure d'invalidité et de décès dans la population. Un grand nombre de ces pathologies est associé à une consommation tabagique importante, mais une partie non négligeable de ces pathologies, en particulier certains cancers, peuvent survenir chez des sujets non-fumeurs. Parmi ces pathologies, le cancer du poumon reste la principale cause de mortalité liée au cancer à travers le monde avec plus de 1,3 millions de morts chaque année. D'autre part, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) qui se caractérise par une inflammation chronique au niveau des poumons, affecte près de 300 millions de personnes à travers le monde et sera la 3^e cause de mortalité en France, en 2020.

De nombreuses études montrent que ces pathologies sont associées à l'altération des processus de régénération et de réparation de l'épithélium respiratoire ainsi qu'à une inflammation chronique au niveau de cet épithélium et il n'existe malheureusement pas à l'heure actuelle de traitement efficace pour ces pathologies.

A travers notre étude, nous proposons d'étudier l'impact pharmacologique de nouvelles molécules inhibitrices d'un acteur majeur de la voie de signalisation intra-cellulaire NF- κ B associée à l'inflammation chronique, dans un nouveau modèle murin de Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive.

Nous avons, dans un premier temps, caractérisé, optimisé et validé la spécificité de ces inhibiteurs *in vitro* sur différentes lignées cellulaires et nous avons maintenant besoin pour poursuivre leur validation dans un modèle animal.

En résumé, notre projet à 3 objectifs :

- 1- Comprendre les mécanismes qui régulent la régénération de l'épithélium respiratoire en condition normale et dans le contexte des maladies pulmonaires (BPCO et cancer du poumon)
- 2- Évaluer l'impact pharmacologique des inhibiteurs dans un modèle animal de BPCO et de cancer du poumon
- 3- Affiner le développement de ces inhibiteurs pour en faire de bons candidats médicaments.

Une étude préliminaire menée dans un modèle murin d'inflammation aiguë avec des inhibiteurs de première génération administrés par voie intra-péritonéale, a permis de montrer des effets anti-inflammatoires significatifs comparés à la dexaméthasone, un corticoïde synthétique. De plus, au cours de cette première étude, aucune toxicité apparente au niveau hépatique ou rénal n'a été observée chez les souris traitées.

L'objectif est maintenant de tester dans un modèle murin de BPCO une seconde génération de ces inhibiteurs ou "lead" qui sont métaboliquement plus stables et qui présentent des effets inhibiteurs plus puissants *in vitro* dans différents types cellulaires.

Nous planifions d'utiliser 612 souris mâles et femelles âgées de 8 semaines et 12 mois dans 3 procédures expérimentales de classe modérée.

Nous nous baserons sur les études que nous avons menées *in vitro* et sur notre expérience de ce type d'étude pour réduire au minimum possible le nombre d'animaux utilisés (ni trop, ni trop peu) pour cela nos résultats seront traités de manière statistique, nous utiliserons des tests statistiques adaptés pour comparer les groupes entre eux.

Nous prendrons également toutes les précautions pour éviter une souffrance psychologique et physique par l'utilisation de conditions optimales, au niveau de l'hébergement, du suivi et des soins. En particulier, nous prendrons en charge la douleur et les altérations du bien-être potentiellement induite par les instillations trachéales, par administration d'antalgiques et d'anesthésiques, par un suivi assidu des animaux en post-opératoire, en apportant les soins recommandés si des complications sont observées, et en euthanasiant les animaux si les points limites sont atteints.

10626 La glycogénose de type I est une maladie génétique rare caractérisée par une incapacité de l'organisme à produire du glucose (sucre) pour maintenir sa glycémie (taux de sucre dans le sang) entre 2 repas. La maladie se caractérise par des hypoglycémies sévères, rapidement après un repas. A l'âge adulte, la plupart des patients développe une maladie rénale, induite par une accumulation anormale de glycogène (forme de stockage du sucre) et de graisses (lipides) dans les reins. La maladie rénale est d'abord silencieuse mais peut être mise en évidence par la présence d'albumine dans les urines (microalbuminurie). En progressant lentement, mais irréversiblement, elle évolue vers une insuffisance rénale. A l'exception d'un contrôle nutritionnel très strict limitant les hypoglycémies, il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour limiter l'avancée de la maladie rénale. La dialyse puis la transplantation rénale sont les seules solutions lorsque l'insuffisance rénale est atteinte. Un espoir pour traiter cette maladie génétique est la thérapie génique.

Une des difficultés associées à la thérapie génique est de faire pénétrer un gène thérapeutique dans les cellules du patient. Actuellement l'utilisation de vecteurs viraux permet de cibler facilement le foie, directement par injection des vecteurs viraux défectifs (ne pouvant pas se multiplier dans l'organisme) dans la circulation sanguine. Le but de ce projet est de cibler les reins par thérapie génique pour prévenir le développement de la maladie rénale de la glycogénose de type I. Pour cela, nous utiliserons une stratégie récemment proposée dans la littérature en injectant des vecteurs viraux directement en veine rénale et non dans la circulation sanguine générale. Par cette technique, les vecteurs viraux devraient être délivrés principalement dans le cortex des reins et guérir localement les cellules malades rénales mais aussi les cellules du foie via leur diffusion dans circulation sanguine générale.

L'efficacité de la thérapie génique sera testée dans un modèle de souris transgéniques reproduisant toute la pathologie rénale de la glycogénose de type I. Ces souris développent les premiers signes cliniques (microalbuminurie) de la maladie rénale qui apparaissent à partir de 6 mois. Cependant, ces souris ne présentent pas d'épisodes d'hypoglycémie car le foie peut produire du glucose, évitant le mal être des animaux. Seul un rein sera injecté avec les virus AAV, permettant de comparer différents paramètres biologiques entre le rein traité et le rein non traité « malade ». L'efficacité du traitement sera évaluée sur la diminution des stocks de glycogène et de lipides intra-rénaux et sur la normalisation des voies métaboliques et de signalisation dérégulées chez les souris malades. Dans ce projet, l'étude sera limitée aux premiers stades de la maladie n'entraînant aucun symptôme, ni mal être chez l'animal.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R :

Remplacement :

L'étude de la pathologie rénale et les tests thérapeutiques sont difficiles à réaliser chez l'homme car le nombre de patients est très limité (1 naissance sur 100 000) et la pathologie est progressive et évolue sur plusieurs années. Il est donc nécessaire de démontrer l'efficacité des traitements chez les souris atteintes de glycogénose de type I. Aucune approche en culture cellulaire ne permet d'apprécier l'efficacité du traitement sur la maladie rénale puisque l'étape limitante est de cibler les cellules rénales *in vivo*.

Réduction : Le nombre total d'animaux a été calculé au plus juste à partir de nos connaissances sur l'évolution de la pathologie dans ce modèle animal. Des groupes de 8 à 10 souris maximum seront étudiés (injection de différents vecteurs optimisés) pour réaliser ensuite des analyses statistiques. Pour limiter le nombre d'animaux, un seul rein sera traité ; l'autre rein sera donc un contrôle non traité permettant d'évaluer l'efficacité thérapeutique. Au total, ce projet nécessitera au maximum 170 souris sur une période de 5 ans.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les animaux seront élevés par groupe dans un environnement enrichi pour favoriser la nidation. Ils seront suivis quotidiennement et pesés régulièrement. Les premiers signes de la maladie rénale (microalbuminurie) sont sans conséquence sur le bien-être animal (maladie silencieuse). La bonne connaissance du modèle animal a permis de définir des points limites. Le suivi du poids des souris et des marqueurs biologiques permettra de connaître régulièrement le stade d'évolution de la maladie des souris, à partir d'un prélèvement

de sang et d'urine. La chirurgie nécessaire pour l'injection des vecteurs en veine rénale sera réalisée dans des conditions d'asepsie, sous anesthésie générale, avec une prise en charge de la douleur pré et post-opératoire. Les souris seront euthanasiées à la fin du protocole ou plus précocement en cas d'atteinte de points limites, selon les méthodes autorisées par la législation afin d'analyser les reins.

En conclusion, l'injection de vecteurs viraux chez la souris atteinte de glycogénose de type I se fera directement en veine rénale. Cette technique devrait permettre de faciliter l'accès des vecteurs pour délivrer le gène thérapeutique au niveau du rein afin de prévenir la maladie rénale de la glycogénose de type I.

10627 Les protéoglycannes (PGs) sont des protéines sur lesquelles sont greffées des chaînes de glycosaminoglycannes (GAGs) (sucre + amine). Ce sont des molécules d'une grande importance de par la variété des processus biologiques dans lesquels ils interviennent. En effet, les PGs sont impliqués dans l'architecture de la matrice extracellulaire, la communication entre cellules, la croissance ou encore la prolifération cellulaire. Ces différentes propriétés des PGs sont principalement dues à leurs chaînes de GAGs. De nombreuses pathologies telles que les pathologies cardiovasculaires (athérosclérose), neurodégénératives (Alzheimer), intestinales (inflammation intestinale) ou encore articulaires (arthrose) sont associées à des perturbations de la synthèse des GAGs. Afin de mieux comprendre l'étiologie de ces différentes pathologies, en particulier le rôle des chaînes de GAGs, nous avons développé un modèle de souris Knock out conditionnel (cKO) pour le gène de la xylosyltransférase-I (XT-I) nous permettant d'éteindre son expression de manière tissu-spécifique.

Trois grands types de lignées de souris seront utilisés :

- Dans le cadre de l'étude de pathologies neurodégénératives, nous utiliserons 3 lignées différentes qui permettront, après injection d'un anti-œstrogène, le tamoxifène, l'extinction du gène de la XT-I de certains neurones du cerveau, le gène mCherry permettant un suivi par fluorescence de l'extinction du gène.

- Dans le cadre des pathologies cardiovasculaires, nous utiliserons 3 lignées différentes qui permettront, après injection du tamoxifène, l'extinction du gène de la XT-I des cellules musculaires lisses et endothéliales des vaisseaux sanguins des souris.

- Dans le cadre de l'arthrose, nous utiliserons une lignée qui permettra, après injection du tamoxifène, l'extinction du gène de la XT-I du cartilage articulaire des souris. Ces souris recevront également trois injections intra-articulaires d'interleukine 1beta (50µg/kg) à l'âge adulte (2 mois) pour étudier leur sensibilité au développement de l'arthrose dans des conditions pathologiques.

Pour toutes les lignées, l'extinction du gène de la XT-I se fera dans un premier groupe de 16 animaux par trois injections successives de tamoxifène (50 mg/kg dans l'huile de tournesol) par voie intra-péritonéale à 2 semaines d'intervalle. Un groupe contrôle sera constitué de 16 animaux injectés avec le solvant (l'huile de tournesol) dans les mêmes conditions. Ainsi ce projet nécessitera l'utilisation de 224 animaux en tout. L'analyse des conséquences de l'extinction ciblée du gène de la XT-I sera réalisée en comparaison aux animaux contrôles par des analyses histologiques et immunohistochimiques, un dosage sanguin de biomarqueurs (hormones de croissance) et une comparaison du poids, de la taille des animaux et de la taille des membres après euthanasie des animaux à l'âge de 8 semaines. Dans le cas de la lignée utilisée dans le cadre de l'étude de la pathologie arthrosique, les animaux seront mis à mort 4 semaines après la dernière injection d'interleukine 1beta, soit à l'âge de 12 semaines.

Même si des expériences sur des modèles cellulaires peuvent être réalisées, seul le modèle animal permet de comprendre le rôle de ce gène *in vivo* dans l'étiologie de ces différentes pathologies (Remplacement). Le maintien des différentes lignées et des lignées intermédiaires (une ou deux mutations) se fait par reproduction au laboratoire, seuls les animaux présentant le génotype souhaité sont conservés (Réduction). Le phénotype ne présente pas de caractère dommageable entraînant une souffrance chez l'animal. Dans un souci d'éthique, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum et est nécessaire et suffisant pour les études statistiques. De plus, afin de

limiter la douleur des animaux lors de l'injection intra-articulaire, celle-ci sera réalisée sous anesthésie générale gazeuse. Le bien-être des souris sera contrôlé quotidiennement et celles présentant des anomalies du comportement (piloérection, cris, cachexie...) et/ou une perte de poids supérieure à 20% par rapport au poids initial seront euthanasiées en conformité avec les recommandations éthiques. (Raffinement).

10628 La douleur a été étudiée sur une variété importante de modèles animaux et la quasi-totalité des antalgiques disponibles actuellement sur le marché ont été testés dans des modèles précliniques chez le rongeur. Ces modèles tendent à mimer des conditions douloureuses décrites chez l'humain, en induisant maladies ou blessures traumatiques, fournissant ainsi des systèmes intégrés utiles à l'étude de situations douloureuses diverses. Si les animaux sont incapables d'auto-évaluation, leurs comportements en réponse à des stimuli nociceptifs peuvent être étudiés de façon fiable et objectivement quantifiés (dimension sensori-discriminative de la douleur). Parallèlement, certains comportements spécifiques peuvent également suggérer la présence de douleur spontanée. La douleur a enfin une composante émotionnelle et cognitive, limitant la capacité des patients souffrant de douleurs chroniques à réagir convenablement aux tâches de la vie quotidienne (anxiété, dépression, qualité de vie altérée). Ces composantes sont difficilement appréhendables chez l'animal mais un intérêt croissant existe pour ces nouvelles approches comportementales visant à évaluer des déficiences émotionnelles et cognitives associées à des douleurs chroniques.

L'activité de la société s'inscrit dans ce cadre, visant à évaluer les propriétés antalgiques de nouvelles molécules provenant de l'industrie pharmaceutique majoritairement. L'offre s'appuie sur une sélection de modèles rongeurs mimant diverses pathologies douloureuses couvrant différentes aires thérapeutiques (neuropathies, pathologies articulaires, gastroentérologie, cancer, douleur post-opératoire, ...) et une diversité de tests comportementaux permettant d'appréhender les multiples composantes de la douleur. Les études d'efficacité antalgique sont exclusivement réalisées chez le rongeur (rats et souris), offrant des mesures robustes et reproductibles sur la base de modèles parfaitement décrits, calibrés et admis par la communauté scientifique.

Les activités de la société s'inscrivent dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Si des méthodes alternatives existent lors des phases précoces de développement d'une molécule (modélisation informatique, ingénierie tissulaire, cellules souches), l'avancement de la caractérisation de la molécule d'intérêt ne permet pas à l'heure actuelle de remplacer l'étude de son efficacité chez l'animal vigile. Pour la société, les progrès méthodologiques et technologiques couplés aux avancées de la connaissance scientifique permettent d'une part de raffiner les modèles animaux existants et d'autre part de développer et proposer des modèles *in vivo* toujours plus proches des situations cliniques (induction de pathologies, mesures des composantes multiples de la douleur). Le raffinement passe également par la réduction autant que possible de la souffrance et du stress des animaux et l'amélioration de leur bien-être. Les expérimentateurs sont formés au respect de l'animal, aux gestes techniques pratiqués sur celui-ci ainsi qu'à leur surveillance poussée. Pour exemple, un suivi post-opératoire important est mis en place après chaque chirurgie (surveillance de l'apparition de signes de réveil, surveillance d'apparition de signes de mal-être, manipulation le plus possible atraumatique des tissus afin de faciliter la récupération, soin apporté aux sutures afin de faciliter la cicatrisation, suivi pondéral, ...). Enfin, pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Dans le cadre de ce projet regroupant les activités de service et de R&D de la société, une estimation présentée en détail pour chaque procédure montre que le nombre d'animaux qui seront utilisés pour la totalité du projet (5ans) est de 32400 (incluant les parties 1 et 2 du projet), soit 6480 rongeurs par an environ.

L'objectif des études réalisées par la société est de fournir à ses Clients des résultats scientifiques, générés dans le respect systématique des normes éthiques les plus élevées, sur l'intérêt de molécules antalgiques destinées au traitement de diverses pathologies douloureuses chez le patient.

10629 Le service CRYOpréservation/redériveration a pour principale mission de cryopréserver les lignées de souris génétiquement modifiées des animaleries dans le but de sécuriser et rationaliser leur utilisation. Dans ce cadre et afin d'atteindre des objectifs du projet, le service doit avoir recours aux animaux transgéniques.

Le service CRYOpréservation/redériveration propose un ensemble de prestations :

- la cryoconservation des lignées murines transgéniques à partir de sperme ou d'embryons
- L'archivage et le stockage de ces paillettes sur deux sites sécurisés bien distincts
- L'échange de lignées entre chercheurs et l'importation de nouvelles lignées par le biais des paillettes congelées
- La revitalisation (et par de là la décontamination) à partir de sperme/embryon congelé par la technique de la fécondation *in vitro* et le transfert des embryons au stade 2 cellules dans des mères porteuses. Le statut sanitaire "très propre" de la zone nécessite une redériveration (une décontamination) quasi systématique des lignées pour leur entrée au sein du plateau central d'archivage par les techniques de transfert d'embryon.

La règle des 3R est respectée. Les procédures sont optimisées avec l'utilisation d'un minimum d'animaux, en utilisant au mieux ses animaux (au bon âge, avec le génotype correct, de bon reproducteur selon le cas.) sans les faire souffrir et en prenant soin d'eux (hébergement). Le protocole de chirurgie utilisé (transfert d'embryons) est réalisé de façon aseptique avec du matériel stérile. Les animaux opérés sont surveillés après intervention. Il faut savoir que la cryopréservation apporte ainsi une solution permanente pour la rationalisation des lignées qui ne sont plus utilisées activement. Elle permet également de réduire les coûts de maintien d'une lignée en animalerie et de lutter contre la dérive des lignées.

Le nombre d'animaux utilisés pendant les 5 ans sera de 5175.

Le service réalise les mises au point et le développement de nouveaux protocoles permettant d'améliorer les prestations proposées.

10630 Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) regroupent la maladie de Crohn, pouvant concerner tout le tube digestif, et la rectocolite hémorragique (ou colite ulcéreuse), limitée aux régions du rectum et du côlon. Ces maladies se traduisent par des douleurs abdominales, des diarrhées, une perte de poids et du sang dans les selles, symptômes affectant grandement la qualité de vie des patients.

D'un point de vue expérimental, un des modèles d'inflammation intestinale couramment utilisé est l'induction d'une inflammation du côlon chez le rat.

Ce modèle tend à mimer des conditions douloureuses décrites chez l'humain, en induisant les maladies, fournissant ainsi des systèmes intégrés utiles à l'étude de situations douloureuses diverses. Il permettra d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires de nouvelles molécules provenant de l'industrie pharmaceutique majoritairement. Les études d'efficacité anti-inflammatoire sont exclusivement réalisées chez le rat, offrant des mesures robustes et reproductibles sur la base de modèles parfaitement décrits, calibrés et admis par la communauté scientifique.

Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Si des méthodes alternatives existent lors des phases précoces de développement d'une molécule (modélisation informatique, ingénierie tissulaire, cellules souches), l'avancement de la caractérisation de la molécule d'intérêt ne permet pas à l'heure actuelle de remplacer l'étude de son efficacité chez l'animal vigile. Le raffinement est mis en place autant que possible pour éviter la souffrance et le stress des animaux. Les expérimentateurs sont formés au respect de l'animal, aux gestes techniques pratiqués sur celui-ci ainsi qu'à leur surveillance poussée. Dans les études de ce projet, un suivi post-induction important est mis en place après chaque induction. Enfin, pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Dans le cadre de ce projet, une estimation montre que le nombre d'animaux qui seront utilisés pour la totalité du projet (1 an) est de au maximum 264 rats répartis sur 6 études.

10631 Dans un contexte où différentes transitions alimentaires touchent ou vont toucher les populations des pays émergents et développés, promouvoir une alimentation saine et durable constitue un objectif primordial pour assurer à la fois la santé publique et un développement agro-alimentaire durable. Ces transitions nutritionnelles recouvrent des changements de l'apport glucido-lipidique qu'on sait impliqués dans les dérégulations métaboliques associées au risque cardiométabolique, et impliquent des changements des teneurs et sources de protéines animales et végétales dont on connaît mal les répercussions métaboliques. Par rapport aux protéines animales, les protéines végétales sont considérées comme de moindre qualité en termes de satisfaction des besoins protéiques, du fait de leurs plus faibles digestibilités et de leurs moindres teneurs en acides aminés indispensables. Néanmoins, on méconnaît les réorientations métaboliques qui seront induites par l'augmentation attendue de la part des PV dans l'alimentation, et qui pourraient se révéler favorable en termes de prévention des dérives cardiométaboliques.

Ce projet vise à mieux connaître l'impact d'une augmentation de la part des PV dans un contexte de régime de type occidental sur les réorientations métaboliques et les dérives cardiométaboliques.

Le projet prévoit donc la mise en place d'une intervention nutritionnelle chez le rat (n=60) afin de caractériser les effets d'une alimentation à base de protéines végétales sur le métabolisme et le risque cardiométabolique dans le contexte d'une alimentation de type occidentale. Les animaux seront nourris avec des régimes normolipidiques ou hyperlipidiques combinés soit à une source protéique 100% animale soit 100% végétale. Ce projet, de nutrition et physiologie intégrative (interactions entre tissus et organes pour l'utilisation des différentes sources protéiques) ne peut être réalisé que sur des organismes intègres et *in vivo*. Aucune méthode *in vitro* ne permet de mettre ainsi en évidence et de quantifier les échanges de nutriments entre tissus et organes dans un contexte de risque cardiométabolique.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale, réduisant au minimum le nombre d'animaux nécessaires pour la réalisation du projet. En particulier, les mêmes animaux sont suivis et prélevés en longitudinal ce qui permet de réduire le nombre d'effectifs et augmenter la puissance statistique. Aucune douleur, angoisse ou souffrance significatives ne sont, a priori, associées à cette procédure, un suivi régulier sera néanmoins effectué.

10632 Le chondrosarcome également appelé tumeur maligne du cartilage, est une tumeur à la fois difficile à diagnostiquer et à traiter. En effet, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode de diagnostic spécifique de cette pathologie et aucun traitement de type chimio- ou radiothérapie a démontré une efficacité antitumorale. La matrice extracellulaire tumorale très dense et peu vascularisée limite la pénétration de nombreuses molécules de chimiothérapie et l'action de la radiothérapie. Le seul traitement utilisé est donc la chirurgie possédant, en cas de rechute et dans les formes les plus graves, un taux de survie à 10 ans de seulement 21%. Fort de ce constat, il est essentiel de mettre au point de nouveaux modèles d'études, et des nouvelles stratégies thérapeutiques. Au sein du laboratoire, une nouvelle lignée cellulaire est utilisée et une stratégie thérapeutique a vu le jour. Pour cela, une prodrogue activable en hypoxie et vectorisée vers les protéoglycanes du chondrosarcome a été synthétisée par notre équipe de chimiste et sélectionnée sur la base de son activité *in vitro*. Une molécule non vectorisée vers les protéoglycanes mais activable en hypoxie a également été synthétisée afin de valider la stratégie de vectorisation.

Les objectifs de cette étude sont :

1/ Mettre au point trois modèles de chondrosarcome différents. Le premier modèle sera un modèle de chondrosarcome de rat implanté en sous cutané chez la souris. Afin de se rapprocher de la pathologie humaine, deux autres modèles seront mis au point à partir de lignées de chondrosarcome humain implantés en position orthotopique chez la souris.

2/ Caractériser les modèles à l'aide de techniques d'imagerie *in vivo* et de valider une nouvelle approche en IRM CEST. Celle-ci sera également validée en regard des caractérisations histologiques réalisées *ex vivo*. Les taux de protéoglycanes et le niveau d'hypoxie, cibles des prodrogues développées par le laboratoire, seront évalués.

3/ Le traitement développé par l'unité sera testé sur les trois modèles de chondrosarcome afin de déterminer son efficacité anticancéreuse sur organisme entier. Le suivi de l'efficacité thérapeutique sera réalisé en imagerie. Le traitement avec la prodrogue nouvellement synthétisée sera comparé au traitement avec la prodrogue non vectorisée et le contrôle consistant en l'injection de sérum physiologique.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3R et est de 221 (20 rats et 201 souris) sur 5ans. Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée.

En effet, de nombreuses études *in vitro* réalisées en amont ont permis de remplacer l'utilisation des animaux notamment pour le test de cytotoxicité des prodrogues développées au laboratoire. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer les effets potentiellement indésirables sur d'autres organes d'une nouvelle chimiothérapie.

Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. L'utilisation et la validation de nouvelles techniques d'imageries permettent de réduire le nombre d'animaux. Ainsi chaque animal est son propre contrôle et pourra être suivi dans le temps. Ces techniques d'imageries permettent de réaliser des caractérisations métaboliques *in vivo* de manière non invasives.

La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification et cabane).

Au final ce projet devrait permettre de 1/valider les trois nouveaux modèles d'études, 2/valider l'utilisation de nouvelles techniques d'imagerie et 3/tester l'efficacité thérapeutique d'une nouvelle prodrogue bi-spécifique.

10633 La nature de l'alimentation influence fortement les qualités sensorielles et nutritionnelles des produits carnés de ruminants. Au-delà de ces critères de qualité, les consommateurs expriment des réticences face à l'intensification des conditions de production, et ils ont une image positive des systèmes herbagers à faibles intrants. Les recherches récentes montrent cependant un risque accru de défauts de qualité sensorielle de la viande et de parasitisme chez les agneaux produits dans les systèmes herbagers à faibles intrants. Les défauts de flaveur/odeur de la viande sont liés à une production accrue de légumineuses dans les prairies des systèmes d'élevage à faibles intrants.

Cette expérimentation a pour but d'étudier l'effet de la durée de pâturage de luzerne avant euthanasie sur (i) les qualités sensorielles, (ii) les qualités nutritionnelles de la viande, notamment la composition en acides gras de la viande et du tissu adipeux et (iii) la fiabilité des méthodes d'authentification de l'origine herbagère de la viande, notamment de déterminer à partir de quelle durée de pâturage la signature de l'herbe dans la viande est stabilisée.

Quatre durées d'engraissement à l'herbe (luzerne) seront comparées 0 j, 20 jours, 40 jours et 60 jours en utilisant 4 lots de 20 agneaux mâles de race Romane mis en expérimentation entre la mise à l'herbe et l'euthanasie (à environ 6 mois). L'expérimentation sera répétée 3 années successives. L'herbe (luzerne) sera offerte en quantité suffisante pour permettre de couvrir l'ingestion volontaire des animaux. Le régime offert en bergerie (lot 0 j) comprendra du concentré et du foin. Le foin sera offert à volonté. Le concentré sera apporté à un niveau permettant d'avoir un profil de croissance moyen similaire entre les agneaux engraisés en bergerie et les agneaux engraisés sur la prairie de luzerne. On ménagera une transition alimentaire de 7 jours au sevrage (augmentation progressive du temps passé sur la prairie de luzerne) pour éviter le risque de météorisation. Une prise de sang sera réalisée à la fin de l'expérimentation, pour analyser les concentrations en testostérone (hormone sexuelle interagissant avec le scatole, composé volatile responsable de défauts de flaveur de la viande).

Le principe des 3R (remplacement, réduction, raffinement) est respecté : (i) nous travaillons sur l'espèce cible (qu'il n'est donc pas possible de remplacer), (ii) notre approche statistique préalable nous permet de limiter le nombre d'animaux expérimentaux, et (iii) les animaliers en charge de l'expérimentation sur le terrain sont expérimentés. Les stratégies prévues pour réduire la douleur, la souffrance et l'anxiété sont :

- une transition alimentaire en début d'expérimentation pour limiter le risque de météorisation
- l'utilisation d'animaux nés et élevés sur place, habitués aux animaliers et aux expérimentateurs
- l'intervention de personnels habitués et formés aux manipulations et expérimentations
- la surveillance régulière des animaux

10634 L'ataxie autosomique récessive cérébelleuse 2 (ARCA2) est un syndrome héréditaire rare qui se caractérise par une ataxie cérébelleuse progressive débutant dans l'enfance, parfois associé à une intolérance à l'exercice, un déficit intellectuel léger, ou des crises épileptiques. Le syndrome est dû à des mutations du gène ADCK3, un gène qui semble avoir un rôle dans la biosynthèse de l'ubiquinone (Coenzyme Q10). Les patients ARCA2 présentent en effet un déficit en CoQ10. A ce jour, nous ne connaissons pas les voies physiopathologiques impliquées dans cette maladie, ce qui empêche de comprendre l'hétérogénéité des symptômes chez les patients. Par ailleurs, aucune approche thérapeutique n'est disponible pour ARCA2.

Nous avons généré dans le laboratoire un modèle murin de la pathologie par mutation du gène ADCK3. Ce modèle reproduit plusieurs symptômes associés à ARCA2 et les symptômes chez la souris (phénotypes) sont modérés et lentement progressifs, se développant entre 5-40 semaines. Par ailleurs, des données biochimiques suggèrent un défaut métabolique et un déficit en CoQ10 dans divers organes. Ces souris constituent donc un bon modèle pour comprendre la physiopathologie de la maladie et pour tester des approches thérapeutiques.

L'objectif de notre projet est de continuer l'étude des symptômes dans ce nouveau modèle, et notamment de comprendre les voies physiopathologiques impliquées dans le phénotype métabolique que nous observons. Les défauts métaboliques que nous avons identifiés peuvent provenir du muscle, du pancréas, du foie ou du tissu adipeux brun. Pour déterminer si le tissu adipeux brun est impliqué, nous évaluerons la thermorégulation des souris ADCK3^{-/-}. Afin de déterminer la contribution de chaque organe dans le phénotype, et de déterminer le rôle d'ADCK3 dans les différents tissus, nous générerons des souris conditionnelles avec la mutation ADCK3 dans le tissu adipeux, le muscle, le foie ou le pancréas en utilisant des souris transgéniques utilisant la Cre recombinase sous un promoteur tissu-spécifique.

REDUCTION : Pour les analyses du phénotype, la mise en culture et toutes les analyses histologiques, sanguines et moléculaires, un nombre total maximal de 640 souris sauvages et 640 souris mutantes sera utilisé soit un total de 1388 souris. Ceci correspond au nombre minimum requis pour avoir des résultats statistiquement significatifs dans nos différents tests, en effet nous utiliserons 10 souris par groupe, effectif optimisé en ce sens.

REMPLACEMENT : L'utilisation de cultures cellulaires primaires permet en partie de réduire le nombre d'animaux, notamment pour les myoblastes et les fibroblastes puisque ce sont des cellules qui se divisent. Par ailleurs, l'utilisation de cultures primaires permet de réduire les procédures effectuées sur l'animal, et de diminuer le nombre d'animaux générés pour les explorations biochimiques et de biologie moléculaire. Il n'existe à ce jour pas de méthodes alternatives pour évaluer la physiopathologie de cette maladie et de tester des approches thérapeutiques. Le recours à l'animal permet de comprendre la fonction d'ADCK3 dans des conditions physiologiques. En effet, le cervelet est une structure complexe avec 4 types majeurs de neurones et plusieurs voies efférentes et afférentes, seuls les modèles murins nous permettront d'identifier la physiopathologie de cette maladie dans le cervelet.

RAFFINEMENT : Enfin une attention particulière sera portée aux animaux développant une faiblesse musculaire avec notamment la mise à disposition de nourriture gélifiée dans la cage, de plus pour toute procédure expérimentale pouvant induire une quelconque souffrance animale une

analgésie sera utilisée. Une observation régulière des animaux sera faite et des points limites sont définis.

10635 L'autophagie est un processus de dégradation et de recyclage que l'on retrouve dans toutes les cellules de l'organisme. Ce processus se comporte comme un système de nettoyage de la cellule, puisqu'il permet entre autre de piéger et dégrader des éléments nuisibles pour le bon fonctionnement de celle-ci. L'activation du processus autophagique et une autophagie fonctionnelle sont généralement associées à un bénéfice santé et une espérance de vie allongée alors que des dérégulations de l'autophagie sont associées au développement de nombreuses pathologies (maladies neurodégénératives, maladies inflammatoires chronique intestinales, maladies infectieuses...).

Ce projet a pour objectif d'étudier :

- l'effet de lipides (apportés par l'alimentation ou en étudiant des animaux incapables de les produire) sur l'autophagie. En effet, il a été observé que l'activité de l'autophagie est sensible aux variations lipidiques et nous souhaitons mieux comprendre comment les lipides régulent l'autophagie.

- l'effet d'une supplémentation en bactéries probiotiques sur l'autophagie. Les probiotiques sont des microorganismes vivants (bactéries ou levures) qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. On sait que la composition de la flore intestinale peut influencer l'activité d'organes situés à distance du tube digestif comme le cerveau ou le coeur. Nous souhaitons analyser si l'ingestion de bactéries probiotiques peut moduler l'activité de l'autophagie dans d'autres organes comme la rétine.

Un nombre total de 416 souris sera nécessaire. Les expériences permettront (i) de connaître le niveau basale d'activité autophagique dans les organes et tissus d'intérêt (tractus digestif, foie, cerveau, cœur, rétine, muscles, testicules, tissu adipeux) et (ii) d'analyser l'impact de lipides et de bactéries probiotiques sur l'activité autophagique dans ces mêmes organes et tissus.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour répondre à la question expérimentale de notre projet qui vise à étudier l'impact de lipides et de bactéries probiotiques sur l'autophagie au niveau de plusieurs tissus et organes. Elle ne peut être remplacée par des modèles *in vitro* qui ne permettraient pas de reproduire la complexité de l'organisme entier et les interactions directes et indirectes qui se mettent en place entre le compartiment digestif/le microbiote intestinal et les autres organes/tissus situés à proximité ou à distance du tube digestif, via notamment la circulation sanguine. Des modèles *in vitro* ne permettraient pas par ailleurs de reproduire la complexité de chacun de ces organes/tissus tant au niveau de leur organisation cellulaire, ceux-ci pouvant être constitués de différents types de cellules polarisées et hiérarchisées, que de leur environnement.

Le nombre de souris nécessaires pour cette étude a été réduit à son minimum (nombre total de souris = 416 (3 expériences indépendantes nécessitant un total de 208 souris ; expériences répétées 2 fois) pour permettre une exploitation statistique et scientifique des résultats.

Afin d'assurer leur bien-être, les souris seront surveillées quotidiennement et leur milieu de vie sera enrichi. Nous nous efforcerons de limiter le stress et l'inconfort liés à l'administration orale des bactéries probiotiques en habituant au préalable les animaux à être manipulés pour la réalisation de ce geste technique.

10636 Domaine : La vaccination est un moyen très efficace de prévention des maladies infectieuses. La vaccination plasmidique (ou ADN) est un mode alternatif de vaccination qui présente de nombreux atouts. Il s'agit d'inoculer au mammifère un plasmide non répliatif, codant pour un antigène vaccinal, qui induit une réponse immunitaire et protectrice contre un agent pathogène.

Objectifs : le but de cette DAP est d'optimiser la vaccination plasmidique dans le modèle murin par i) la délivrance de plasmides dans la peau, site optimal par sa commodité d'accès et par sa richesse en cellules présentatrices d'antigènes, ii) le ciblage des cellules présentatrices d'antigènes de la peau par fusion de l'antigène avec une séquence de ciblage, iii) l'optimisation de l'expression des plasmides par électro-transfert, iii) l'intérêt de l'addition de la voie intramusculaire à la voie cutanée.

La combinaison de ces paramètres d'optimisation, réalisés sur un antigène rapporteur, la luciférase, permettra de révéler l'expression du plasmide et de déterminer quel est le protocole le plus efficace sur un plan générique. Les résultats constitueront une avancée dans le domaine de la vaccination plasmidique, pour laquelle nous ne disposons que de résultats parcellaires dans la littérature. Ce protocole optimisé sera utilisé dans un second temps, en dehors de cette DAP et par un laboratoire partenaire collaborateur, pour la mise au point d'un vaccin plasmidique contre le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift.

Règle des trois R : Remplacement : le projet portant sur la vaccination, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Les animaux utilisés sont des rongeurs (souris de laboratoire) qui proviennent d'élevages reconnus. Réduction : le projet prévoit le recours à un maximum de 500 animaux provenant d'élevages autorisés. Le nombre a été réduit au minimum pour permettre une analyse statistique fiable. Une même souris sera utilisée pour tester 2 méthodes d'introduction du plasmide dans l'organisme. Des expériences successives seront conduites pour affiner les paramètres de transfert sur la base de premiers résultats, et pour réduire le nombre de lots d'animaux de manière rationnelle. Raffinement : l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur éventuel sachant que l'électro-transfert de plasmide utilisé dans de bonnes conditions n'induit pas de douleur. Lors de l'administration des vaccins, les souris seront toutes anesthésiées pour éviter tout inconfort selon un protocole validé par un vétérinaire. La grille nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Si une inflammation aigue avec début de nécrose était observée après l'administration de manière inattendue, les souris concernées seraient euthanasiées.

10637 En plus des traitements standards (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie), de nombreux patients atteints d'un cancer sont traités depuis quelques années par immunothérapie. L'immunothérapie est un traitement qui vise à "mobiliser" les défenses immunitaires du patient contre sa maladie et cette approche génère de grands espoirs chez les patients. Malheureusement, bien que de nombreux travaux de recherche ont obtenu des résultats spectaculaires par cette approche, un grand nombre de patients atteints de cancer ne réagissent pas ou peu à l'immunothérapie. En effet, on distingue chez les patients deux cas de figures : les tumeurs « chaudes » (10 à 30% des cas) où une réponse immunitaire contre la tumeur préexiste et qui répondent très bien à l'immunothérapie, et les tumeurs « froides » (70 à 90% des cas) où il n'y a pas de réponse antitumorale préexistante et où l'immunothérapie est peu ou pas efficace.

La radiothérapie est un traitement locorégional des cancers, consistant à utiliser des rayonnements ionisants (dits aussi "rayons" ou "radiations") pour détruire les cellules cancéreuses. Dans certains cas, la radiothérapie peut diminuer la croissance tumorale à distance de la zone d'irradiation (métastase). En oncologie, ce phénomène est appelé « effet abscopal ». Les mécanismes régissant l'effet abscopal n'ont pas été entièrement élucidés, mais ils impliqueraient l'activation du système immunitaire, qui en réponse, détruirait les cellules cancéreuses.

Des études précédentes indiquent que des nanoparticules en combinaison avec la radiothérapie permettraient d'activer une réponse immunitaire contre la tumeur, transformant des tumeurs « froides » en tumeurs « chaudes ». Il s'agit dans ce projet de démontrer que cet effet est transposable à distance à une tumeur secondaire non traitée (effet abscopal).

Les nanoparticules sont des objets de diamètre compris entre 1 et 100 nm. Dans ce projet, les nanoparticules d'oxyde d'Hafnium testées sont inertes et conçues pour augmenter la dose de radiothérapie à l'intérieur de la tumeur, sans augmenter les dommages aux tissus sains. Les données précliniques sur la combinaison de ces traitements (nanoparticules + agent immunomodulateur + radiothérapie) n'existent pas, il est donc indispensable d'utiliser un modèle animal, seul capable de reproduire à la fois la complexité du développement tumoral, son microenvironnement et la réponse immunitaire pour obtenir ces données.

Les modèles de cancer chez les souris immunocompétentes ont été choisis avec soin en se basant sur la bibliographie existante et leur utilisation pour l'étude de traitements anti-cancéreux à travers toute la recherche en immunoncologie.

Le calcul du nombre d'animaux nécessaire a été réalisé à l'issue d'une étude statistique poussée permettant de limiter au strict minimum la quantité d'animaux utilisés tout en garantissant la robustesse des études. Au total, 1680 animaux seront utilisés au maximum pour les 5 ans que durera le projet. L'inconfort, la douleur ou l'angoisse des animaux potentiellement liés à la toxicité du composé (bien qu'aucune toxicité ne soit attendue) seront traités par des médicaments adaptés de type anesthésiques, analgésiques (anti-inflammatoires, morphiniques).

10638 L'hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) correspond à une issue de sang d'origine artérielle dans les espaces sous-arachnoïdiens. Sa principale étiologie est la rupture d'un anévrysme artériel intracérébral. L'impact socio-économique de cette pathologie est majeur puisqu'elle touche des sujets jeunes dont un tiers des survivants conservent de lourdes séquelles neurologiques. Le principal facteur associé à l'importance du handicap post HSA est la survenue d'une ischémie cérébrale retardée (ICR). Or, à ce jour, en dépit de plusieurs décennies de recherche, aucune thérapeutique testée chez l'homme n'a fait la preuve de son efficacité pour réduire l'incidence de l'ICR. Cette situation s'explique par le fait que la physiopathologie de l'ICR n'est que partiellement connue. L'objectif de ce projet est de tester une stratégie thérapeutique permettant de réduire les effets délétères de l'HSA sur le cerveau et ainsi améliorer le devenir des patients.

Pour cela, un modèle d'hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) par injection intra-cisternal de sang artériel autologue, permettant de mimer la physiopathologie humaine, sera développé chez le rat Sprague Dawley mâle de 300g. Le rat semble l'espèce la plus adaptée pour cette étude du fait que ce modèle a mis au point et caractérisé dans cette espèce.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner). Notre projet correspond à l'étape de validation *in vivo* de notre stratégie thérapeutique, qui fait suite aux validations réalisées *in vitro*, et ne nous permet donc pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal. De ce fait, toutes les procédures seront organisées afin de réduire l'inconfort et le stress liés à la manipulation de l'animal. Toutes les procédures douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale associée à une couverture analgésique pour limiter au maximum les sensations de douleur. De plus, l'association d'une étude de puissance statistique basée sur la littérature ainsi que l'utilisation de techniques d'évaluation non invasive comme l'IRM permettront de réduire drastiquement le nombre d'animaux utilisés (n=106).

Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes suite à la chirurgie. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à l'euthanasie de l'animal.

Mots clefs : Hémorragie sous-arachnoïdienne ; neuroprotecteur ; IRM ; comportement

10639 Le cancer colorectal est le 4ème cancer en France et le 2ème cancer en termes de mortalité avec 18000 décès par an. Il est précédé par une tumeur bénigne (polype adénomateux) dans la plupart des cas. Un nouveau test fécal immunologique devrait faire augmenter le nombre de lésions détectées à un stade précoce. Suite au dépistage ces tumeurs sont retirées et analysées. Pour les cas où un foyer de cancer est détecté au sein du polype, une technique de résection tumorale endoscopique : la dissection sous muqueuse endoscopique a été développée. Cette technique permet d'enlever en un fragment ces lésions précancéreuses ce qui permet de vérifier que la résection est complète jusqu'en marge saines du cancer sans qu'il ne soit nécessaire de faire de résection chirurgicale complémentaire.

La dissection sous muqueuse évite un nombre conséquent d'interventions chirurgicales dont la mortalité et la morbidité sont plus élevées. Néanmoins, elle expose à des complications hémorragiques et à des perforations intestinales dont la fréquence est inversement proportionnelle

au degré d'expertise des endoscopistes. Il est donc nécessaire d'avoir des endoscopistes entraînés ayant moins de complications et sachant les traiter endoscopiquement.

L'entraînement à la dissection sous muqueuse permet également, par la maîtrise de la technique, de diminuer les durées de procédure et donc les temps d'anesthésie pour les patients. Il est estimé que pour être efficient en dissection sous muqueuse, il faut réaliser environ 30 procédures par an.

Un simulateur a été fabriqué mais ne permet pas aujourd'hui de reproduire les conditions *in vivo*. C'est pourquoi afin d'être au plus proche de la procédure chez l'homme, avec gestion des mouvements respiratoires, mais également de complications (hémorragie et pneumopéritoine) l'apprentissage sur animal vivant et donc essentiel. Le modèle porcin est le plus proche de l'homme.

L'objectif de ce programme de formation est de former des endoscopistes interventionnels à la technique de la dissection sous muqueuse endoscopique et de leur permettre un nombre adéquat de procédures afin qu'ils puissent réaliser sans risque cette technique chez l'homme.

Les porcs arrivent sur place quelques jours avant la procédure pour leur permettre de s'habituer aux lieux et ainsi de diminuer leur stress. L'hébergement se fait en box individuel pour éviter de compromettre l'expérimentation. Cependant l'agencement des boxes permet de maintenir le lien social entre les porcs dans une animalerie agréée par le MAAAF. Les boxes ont une superficie de 5,3 m² et sont agrémentés de jouets pour le bien-être des porcs. En cas de température inférieure à 10 degrés dans l'animalerie, un système de chauffage individuel est activé.

Les interventions se déroulent sous anesthésie générale et les animaux sont euthanasiés par injection létale à la fin de chaque intervention. Il n'y a donc pas de souffrance animale induite par la procédure. Afin de réduire le nombre d'animaux impliqués, chacun subit jusqu'à neuf procédures lors de l'intervention. Cette mesure permet de limiter à 16 le nombre maximal d'animaux nécessaires par an, soit 80 au maximum sur 5 ans.

10640 Le foie est un organe central dans la régulation du métabolisme. Chez l'homme comme chez la souris, il stocke des nutriments sous diverses formes, et joue un rôle de tampon dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Ce métabolisme est en partie contrôlé par la voie de signalisation de l'Insuline. Lorsque l'Insuline se fixe à son récepteur, elle enclenche une cascade de réactions faisant intervenir une multitude de protéines (PI3K, PDK/AKT/mTORC) aboutissant à l'entrée et la prise en charge du Glucose dans la cellule. Dans différents contextes (vieillesse, obésité, lipotoxicité), la voie de signalisation de l'Insuline devient plus sensible et mène progressivement à l'apparition d'une insulino-résistance et d'un diabète de type II.

La voie de signalisation de l'Insuline fait intervenir plusieurs protéines kinases et phosphatases. Parmi elles, la phosphatase PTEN assure la production de phosphatidyl-inositol (4,5) phosphate (nommé PIP₂) à partir du phosphatidyl-inositol (3,4,5) phosphate (nommé PIP₃). Outre son rôle essentiel dans le contrôle de la voie de signalisation de l'Insuline, PTEN est impliquée dans le contrôle tumoral, elle participe à la régulation du cycle de division cellulaire en empêchant les cellules de se diviser trop rapidement et de façon incontrôlée. En conséquence, il est connu que l'absence de PTEN chez la souris entraîne l'apparition de cancers et notamment le cancer du foie (nommé hépatocarcinome).

Dans ce cadre, nous étudions les effets de l'absence de la phosphatase PTEN dans les réponses à la prise alimentaire (période riche en Insuline) et au jeûne (période pauvre en Insuline) chez des souris mâles et femelles. La souris est un modèle de choix pour nos expériences car adapté aux mécanismes que nous étudions et qui nous permet d'invalider une protéine d'intérêt dans un organe en particulier. Ainsi, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées qui n'expriment pas cette protéine uniquement dans le foie. Pour évaluer l'importance de ces 3 facteurs (le contexte nutritionnel, le transgène et le genre), nous utiliserons des souris transgéniques et leur contrôle non modifié que nous diviserons en 8 groupes de souris : 4 lots de 8 souris mâles ou femelles, dont le gène PTEN a été invalidé au niveau du foie et qui sont nourries *ad libitum* ou mises à jeun et 4 groupes de souris de type sauvage mâles ou femelles nourries ou mises à jeun. Ainsi, pour cette expérience, 64 souris seront utilisées, un nombre suffisant et nécessaire pour obtenir des résultats interprétables et de façon fiable. L'utilisation de l'animal entier est indispensable puisque nous

étudions le dialogue entre plusieurs organes dans la régulation des voies métaboliques. Les souris utilisées seront génétiquement proches (même fond génétique et même âge) permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés dans un même groupe d'expérimentation. Ces souris seront hébergées dans des locaux d'animalerie appropriés dans un environnement contrôlé et enrichi (cages avec petites cabanes en inox), leur apportant les meilleures conditions de bien-être et de santé. Elles seront surveillées de façon quotidienne par du personnel qualifié. En fin d'expérience, les animaux seront euthanasiés afin de prélever du sang et des organes d'intérêt (foie, tissus adipeux blanc et brun) pour des explorations moléculaires et biochimiques.

10641 L'autisme et plus largement le trouble du spectre autistique (TSA) est un trouble sévère et précoce du développement qui affecte les fonctions cérébrales. De prévalence alarmante (une naissance sur 100), le TSA est un handicap lourd non seulement pour l'enfant qui en est atteint mais également pour son cercle familial. Le tableau clinique regroupe des altérations de la communication et des interactions sociales, un isolement, associées à des comportements restreints et répétitifs. L'étiologie de ce trouble repose sur des facteurs génétiques mais également sur des facteurs environnementaux. Plusieurs facteurs pré-et périnataux ont été incriminés tels que des infections par le virus de la rubéole ou par des médicaments comme l'acide valproïque ou encore la thalidomide. Plus récemment, il semblerait que des polluants environnementaux tels que les métaux lourds, les polybromodiphényléthers (PBDE) qui constituent une famille de retardateurs de flamme bromés ou encore les polychlorobiphényles (PCB) qui sont des polluants organiques persistants (POP) soient des facteurs de risques émergents du TSA. Ces polluants ont la capacité d'altérer directement ou indirectement le développement cérébral pendant des périodes critiques de son développement que sont la gestation et la lactation.

A côté des PBDE, un des retardateurs de flamme les plus utilisés actuellement est l'hexabromocyclododécane (HBCDD). Il est ajouté dans les matériaux d'isolation thermique utilisés dans l'industrie du bâtiment. Sa production et son utilisation sont réglementées et il a été inscrit récemment à l'annexe A de la convention de Stockholm en tant que POP. L'homme y est principalement exposé via l'alimentation (poisson, viande, œuf) et l'ingestion de poussières domestiques. En France, l'exposition moyenne journalière est estimée à 0,21ng/kg de poids corporel pour un adulte alors qu'elle est plus élevée pour les jeunes enfants. Les quelques données toxicologiques sur ce polluant révèlent une neurotoxicité développementale potentielle avec des altérations de l'axe thyroïdien qui peuvent être responsables d'altérations développementales cérébrales et d'impacts comportementaux persistants sur le restant de la vie en raison du rôle clé des hormones thyroïdiennes dans la maturation du système nerveux central. Se faisant, l'HBCDD, à l'instar d'autres retardateurs de flamme bromés, pourrait également être un facteur de risque émergent de TSA. Pour explicitement tester cette hypothèse, des études expérimentales sont nécessaires. Le présent projet a pour objectif d'examiner l'association spécifique entre une exposition périnatale à l'alpha-HBCDD (isomère majoritairement retrouvé dans l'organisme suite à une exposition par l'alimentation) et le risque de TSA. Ce projet d'une durée d'un an inclura 24 femelles rats Wistar gestantes et leurs descendants (10 ratons par portée). Le modèle expérimental de TSA mis en œuvre reposera sur l'administration unique d'acide valproïque (VPA) à un stade bien défini de la gestation chez la femelle qui est le 12^e jour de la gestation. L'exposition à l'alpha-HBCDD sera faite par voie orale au cours de la période de gestation et de lactation afin de mimer le développement humain dans un environnement contaminé. Quatre groupes de 6 femelles seront constitués : un groupe contrôle, un groupe soumis à l'acide valproïque (VPA) (agent induisant le TSA), un groupe exposé à l'alpha-HBCDD et un dernier groupe soumis au VPA et exposé à l'alpha-HBCDD. Le développement du TSA sera évalué au travers de divers tests comportementaux, réalisés chez le jeune raton (stade postnatal (PND) 0 à 21 jours) et au stade de jeune adulte (PND 22 à 90). Ces tests viseront à étudier 1) le développement moteur et de maturation sensorielle (test de retournement, test d'agrippement, géotaxie négative, suspension par les pattes antérieures, test de coordination motrice, openfield, test de discrimination olfactive, test de la reconnaissance d'objet), 2) les interactions sociales avec la mère (vocalisations ultrasonores) et avec d'autres congénères (test de sociabilité de Crowley), 3) le comportement exploratoire et le niveau d'anxiété (openfield, labyrinthe en croix surélevée). D'autres tests comportementaux seront réalisés chez la

femelle ayant mise bas afin d'évaluer son comportement maternelle (soins apportés à la construction du nid, regroupement des jeunes). De plus, une étude de l'intégrité de la barrière hématoencéphalique (BHE), interface entre le sang et le cerveau, chez certains descendants (PND 22 et 91) sera entreprise afin d'évaluer la toxicité cérébrovasculaire potentielle de l'alpha-HBCDD, élément qui pourrait contribuer au plus grand risque de TSA en cas d'une exposition chronique avec ce polluant. Pour cela les animaux seront euthanasiés en vue de collecter les microvaisseaux cérébraux, siège anatomique de la BHE, et étudier l'intégrité de ces structures. Enfin, les animaux qui n'entreront pas dans l'étude de l'intégrité de la BHE seront euthanasiés selon les recommandations éthiques et les cerveaux seront prélevés en vue de réaliser d'études histologiques (PND 10, 14, 21 et 90 jours).

Les animaux seront surveillés suite à l'exposition au contaminant sur les points limites suivants : diminution de la consommation alimentaire et hydrique, baisse du poids corporel et modification de l'apparence physique externe de l'animal. Si l'un de ces points limites vient à apparaître, les animaux seront placés sous surveillance accrue. En cas d'aggravation de l'état de l'animal, ce dernier sera euthanasié selon les recommandations éthiques en vigueur.

Ce travail nécessite le recours à l'animal entier mimant la complexité de l'organisme pour la phase d'exposition au contaminant mais également pour l'induction du TSA, il n'existe donc pas de méthodes alternatives (remplacement). Les expérimentations seront effectuées selon la réglementation et les recommandations en vigueur (raffinement). Le nombre d'animaux sera cependant limité au minimum afin de garantir la validité et l'interprétation scientifique des résultats (réduction).

10642 La notion que les systèmes neuroendocrinien et immunitaire interagissent, échangent des informations et contrôlent réciproquement leurs activités est encore assez nouvelle mais il est maintenant admis que le cerveau et le système neuroendocrinien peuvent jouer un rôle immunorégulateur, et qu'inversement les cellules immunitaires peuvent influencer l'activité neuronale. L'intestin représente la plus grande barrière entre le milieu extérieur et l'intérieur de notre organisme et est en contact constant avec des antigènes potentiellement pathogènes. Le maintien de l'homéostasie intestinale, c'est-à-dire de la balance entre tolérance (aux nutriments par exemple) et immunité (contre des bactéries pathogènes par exemple), est crucial pour notre survie. De récentes études montrent justement que les interactions des systèmes neuronaux et immunitaires sont déterminantes dans plusieurs processus physiologiques et pour maintenir l'homéostasie intestinale. L'élimination d'un pathogène est souvent associée à une inflammation créant des dommages tissulaires collatéraux, qui peuvent avoir des effets très néfastes sur l'hôte. La modulation de la réponse immunitaire et la capacité de tolérance à la présence de pathogènes sont donc essentielles pour la défense de l'organisme. Les interactions entre les systèmes neuroendocrinien et immunitaire jouent un rôle important dans ces processus de régulation. En particulier, deux axes représentent les deux principales voies d'échange (crosstalk) entre le cerveau et le système immunitaire : les axes hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) et adrénargiques. Ces axes participent donc au maintien de l'homéostasie mais sont aussi activés lors d'un stress. Un stress peut être psychologique mais aussi environnemental ou infectieux. Par exemple un agent chimique va induire une inflammation, un changement d'homéostasie qui va être perçu par le système nerveux comme un stress. Tous les stress induisent rapidement une cascade de signaux qui vont permettre une réponse physiologique adaptée dans une multitude de cellules. L'intestin est une cible majeure du stress, comme nous l'avons tous expérimenté un jour ou l'autre. Dans l'intestin, le stress peut induire des modifications fonctionnelles (diarrhée, spasmes, etc.) mais aussi des maladies inflammatoires telles que le syndrome de l'intestin irritable, touchant de plus en plus de patients dans nos sociétés occidentales « stressées ». Les deux principaux médiateurs du stress sont les glucocorticoïdes (GCs), sécrétés par l'axe HPA, et l'adrénaline et la noradrénaline (abrégées par nor/adrénaline dans la suite de ce document) sécrétées par l'axe adrénargique. Ces neurohormones sont sécrétées dans la circulation mais aussi directement dans les tissus où elles interagissent avec une pléthore de cellules. En effet, la plupart des cellules de notre organisme expriment les récepteurs à ces neurohormones et y répondent de manières différentes et adaptées.

Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) sont des cellules récemment découvertes, qui jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et dans la défense précoce contre les infections. Ces cellules sont présentes aux différentes interfaces environnementales et particulièrement dans l'intestin. Elles sont sensibles à leur environnement et sont capables de réagir rapidement à tout signal ou changement provenant de cet environnement. Notre projet s'intéresse à étudier la réponse de ces cellules aux neurohormones du stress que sont les GCs et la nor/adrénaline. En d'autres termes, nous voulons comprendre comment ces neurohormones de stress régulent la fonction des ILCs de l'intestin. Les ILCs expriment le récepteur aux GCs ainsi que le récepteur à la nor/adrénaline. Nous avons donc généré des modèles de souris dans lesquels le récepteur aux GCs ou le récepteur à la nor/adrénaline est supprimé sélectivement et uniquement dans les ILCs. Dans ces souris, les ILCs ne pourront donc pas intégrer le signal de stress (GCs ou nor/adrénaline) et ne pourront donc pas y répondre. Pour étudier l'effet plus global de la nor/adrénaline, nous avons aussi des souris dans lesquelles le récepteur à la nor/adrénaline est supprimé sur toutes les cellules de l'organisme. Nous comparerons la réponse immunitaire des souris mutées et des souris contrôles lors de différents stress pathologiques spécifiquement de l'intestin. Nous utiliserons des stress inflammatoires, infectieux, et un modèle de cancer colorectal pour avoir une vision globale, claire et complète du rôle des GCs et de la nor/adrénaline sur les ILC de l'intestin. Les stress inflammatoires seront provoqués par l'administration de dextran sodium sulfate dans l'eau que boivent les animaux, ce qui induit une réponse inflammatoire spécifique du colon. Pour étudier l'intestin grêle, nous injecterons de l'indométhacine dans le ventre des souris, ce qui induit des ulcères. Le stress infectieux sera provoqué par le parasite *Toxoplasma gondii*, qui colonise l'intestin grêle. Nous utiliserons un modèle de cancer colorectal induit par l'inflammation utilisé couramment par la communauté scientifique et qui consiste en une injection d'azoxyméthane, un carcinogène, suivi par l'administration à intervalles réguliers de dextran sodium sulfate dans l'eau. Ces projets seront réalisés dans le respect de la règle des 3R : une réduction au minimum du nombre de souris utilisées, par exemple en réduisant le nombre de souris contrôles, le raffinement des méthodes utilisées avec des points de limites stricts pour limiter à tout prix la souffrance des souris, et enfin, comme nous ne pouvons pas remplacer ces modèles animaux par des modèles *in vitro*, nous exploiterons au maximum toutes les données pouvant être recueillies d'une expérience en combinant plusieurs méthodes d'analyses quand cela est possible. De plus, les souris seront hébergées conformément à la réglementation, en conditions A1+ avec nourriture et boisson *ad libitum*. Chaque cage comportera un maximum de 5 souris et sera enrichie d'un petit abri en carton. Tout au long de ce projet, nous travaillerons par ailleurs en étroite collaboration avec un bioinformaticien / statisticien, dans le but d'optimiser le rapport entre le nombre d'animaux utilisé et la robustesse des tests statistiques qui seront appliqués à l'analyse des données collectées. Dans cet objectif, nous prévoyons d'utiliser 2952 souris pour mener à terme ces projets.

10643 Les chevaux au pâturage sont infestés par une large gamme d'espèces parasitaires, dont les strongles digestifs (cyathostomes). Les cyathostomes sont responsables de retard de croissance, de colique et d'un syndrome de cyathostomose larvaire pouvant conduire à la mort de l'animal. Leur gestion a longtemps reposé sur les vermifuges dont l'efficacité diminuent en lien avec la sélection de populations parasitaires résistantes. Les recherches actuelles s'intéressent à comprendre les interactions entre le microbiote digestif du cheval et la communauté de cyathostomes, afin de mieux caractériser les perturbations de flore putatives associées au parasitisme et disposer de nouveaux marqueurs d'infestation faciles à mesurer et permettant de ne vermifuger que les seuls chevaux en ayant besoin.

La compréhension de ces interactions nécessite de se placer en conditions d'infestation expérimentales afin de contrôler précisément la dose infectieuse tout en s'affranchissant du biais lié à la variation de la composition nutritionnelle de l'herbe (qui impacte la composition du microbiote) pour des chevaux à l'herbe. Nos études précédentes ont basé les protocoles d'infestation par l'administration d'une dose de 30000 larves infestantes à des chevaux vermifugés à la moxidectine. Cette molécule permet une "remise à zéro" de la charge parasitaire des chevaux avant l'expérimentation, en éliminant l'ensemble des stades parasitaires adultes et larvaires, mais exerce son effet durant 90 jours. Un protocole d'infestation classique nécessite donc le maintien de chevaux

au box durant 3 mois, avant toute infestation qui dure ensuite 60 jours en moyenne afin de laisser le temps suffisant au parasite pour compléter son cycle de vie.

Dans un souci d'amélioration de nos procédures expérimentales, nous proposons de tester un autre protocole de vermifugation permettant d'obtenir le même effet que la moxidectine, et de réduire la dose infestante.

Le projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3Rs :

Substitution (Remplacement) : à l'heure actuelle aucune méthode de culture *in vitro* n'est disponible.

Réduction (Réduction) : notre étude vise à réduire la durée d'expérimentation totale, et portera sur un nombre minimal d'individus (n=15) choisis sur la base de leur niveau d'infestation moyen avant expérimentation pour minimiser la variabilité inter-individuelle.

Amélioration (Raffinement) : notre étude porte spécifiquement sur ce point, en cherchant à minimiser la dose infectante et affiner le protocole de vermifugation pré-expérimental. Tout animal présentant une coproscopie au-dessus de 2000 œufs/g, ou des signes de coliques ou de diarrhées sera vermifugé et sorti du protocole.

10644 Pouvoir ordonner des évènements successifs dans le temps est une faculté clé permettant la planification des actions et de décision. La perturbation de la perception de l'ordre temporel pourrait être à l'origine de troubles liés à la schizophrénie mais aussi un symptôme préclinique permettant de l'anticiper.

Le but est d'étudier les mécanismes neuronaux et les structures impliquées dans la perception de l'ordre temporel chez le rat. Nous chercherons à caractériser les capacités de jugement d'ordre temporel de stimuli auditifs et audio-visuels chez le rat et de déterminer leurs corrélats neurophysiologiques (électrophysiologie *in vivo*) dans certaines structures cérébrales.

Pour ce projet, nous utiliserons un maximum de 672 rats mâles adultes pour l'ensemble des quatre séries expérimentales.

La règle des 3R sera suivie de la manière suivante : (1) Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. (2) Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes, et utiliserons anesthésie et analgésie avant chaque procédure chirurgicale de façon adaptée au poids de l'animal. Les animaux seront logés avec de l'enrichissement autant que possible. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience, en particulier après les procédures chirurgicales, afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation. (3) Ce projet de recherche fondamentale fait partie des Neurosciences comportementales, nécessitant donc d'être mené sur des animaux vivants notamment lors de l'étude du comportement précédant et suivant des injections pharmacologiques ainsi que durant l'électrophysiologie *in vivo*.

10645 Contexte scientifique :

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de décès dans le monde. Malgré les progrès récents et la mise en place de stratégies thérapeutiques visant à diminuer le mauvais cholestérol dans le sang, plus de 17 millions de patients décèdent de pathologies cardiovasculaires chaque année. Récemment, l'inflammation est apparue comme une composante centrale contribuant au développement des maladies cardiovasculaires mais les mécanismes qui régissent cette inflammation restent inconnus. Ce projet vise à identifier et valider de nouvelles voies métaboliques, et notamment le rôle de l'enzyme glutamate déshydrogénase (Glud1), qui contribue à l'inflammation liée aux maladies cardiovasculaires.

Problématique :

Le dérèglement des cellules immunitaires est souvent associé à la progression des maladies cardiovasculaires. Les cellules immunitaires sont générées dans la moelle osseuse au cours d'un processus dynamique nommé l'hématopoïèse. Le métabolisme joue un rôle clé dans la modulation de l'hématopoïèse et ainsi contrôle le nombre de cellules générées et de plus façonne leurs fonctions. Nous nous intéressons à la contribution de l'enzyme Glud1 dans ces processus. Des

mutations humaines de cette protéine sont à l'origine du syndrome d'hyperinsulinémie-hyperammonémie. Néanmoins, le rôle de cette enzyme au sein des cellules immunes reste inconnu.

Hypothèse de travail :

Notre projet vise à enlever de manière sélective Glud1 au sein des cellules immunes et regarder les conséquences au niveau de l'hématopoïèse, notamment dans les modèles précliniques d'athérosclérose. Pour cela nous allons utiliser des modèles murins appropriés afin de déterminer les mécanismes qui régulent l'activité de ces cellules. Nous analyserons cela dans des modèles précliniques de pathologies cardiovasculaires bien définis et validés par la communauté scientifique.

Justification du modèle et raffinement :

Les maladies cardiovasculaires sont des pathologies complexes dans lesquelles de multiples voies métaboliques et physiologiques interviennent. Une approche de culture cellulaire n'est pas adaptée afin de répondre aux demandes de cette problématique. Des modèles murins athérogéniques ont été développés et validés par la communauté scientifique comme outils d'études précliniques. Pour répondre à la règle des « 3R » nous allons utiliser des tests statistiques nous permettant de réduire le nombre d'animaux afin de pouvoir tout de même répondre clairement à notre question scientifique. Les procédures proposées sont basées à la fois sur une justification scientifique et tiennent compte du bien-être animal. Comme décrit précédemment, aucune méthode alternative *in vitro* ou *in silico* n'est adaptée afin de remplacer le modèle murin. La mise en place de points limites permet l'amélioration du bien-être animal afin de supprimer la détresse ou l'angoisse des animaux.

Perspectives :

Cette étude pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de traitement visant à mieux contrôler la génération des cellules immunes et ceci dans les maladies cardiovasculaires. Afin de pouvoir conclure sur l'importance de cette voie métabolique nous avons calculé (test de significativité statistique) que 440 souris devraient être utilisées et réparties sur une période de 4 ans. L'ensemble des procédures proposées dans ce projet sont connues comme non remplaçables, par des procédures ne faisant pas intervenir directement l'animal.

10646 Une tumeur est soumise de façon physiologique à des contraintes mécaniques lors de sa croissance. Cependant ce que l'on ne sait pas est quel est l'effet d'une compression mécanique supplémentaire sur une tumeur ou une cellule tumorale ? Certains pensent que cela permettrait de stopper le développement tumoral (de possibles « guérisons » de supposés cancers du sein ont été décrites au XVIème siècle) alors que d'autres pensent au contraire que cette pression mécanique pourrait modifier le comportement des tumeurs / cellules tumorales et les rendre plus agressives localement et à distance (métastases), voire induire un développement tumoral sur des tissus prédisposés.

L'objectif de cette expérience sera alors de déterminer si une compression mécanique rend les cellules tumorales du côlon plus agressives ou bien si au contraire la compression inhibe le développement tumoral.

Pour cela, l'expérience consistera à injecter des cellules tumorales murines coliques dans la rate de souris immunocompétentes (injection intrasplénique) afin de les faire passer dans le sang (passage par la veine porte) pour qu'elles arrivent au niveau du foie et donnent des métastases, sous contrainte mécanique ou pas : Cette dernière sera apportée via un aimant posé sur le lobe du foie qui va attirer les cellules cancéreuses chargées magnétiquement. La lignée CT26 utilisée a été transduite de façon stable par un gène codant pour la luciférase permettant un suivi non invasif de l'évolution tumorale.

L'utilisation d'animaux est nécessaire pour mettre en évidence la capacité des contraintes mécaniques à modifier le phénotype tumoral des cellules tumorales et notamment leur potentiel métastatique. Pour ce projet, nous utiliserons 20 souris Balb/C. Ce nombre a été déterminé de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude et

que ce dernier puisse nous permettre d'obtenir des résultats exploitables afin de répondre à notre problématique.

Le bien-être des animaux sera respecté en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésique. Afin de limiter la souffrance des animaux, ils auront une injection d'analgésique en préopératoire qui sera renouvelée toutes les 12 heures pendant les 48 heures post-opératoires. Les points limites seront les suivants : perte de poids > 20%, comportement anormal (yeux fermés, dos voûté, isolement), apparence physique anormale (automutilation, plaies), gêne pour se déplacer, charge tumorale >10% et envahissement des tissus adjacents. Nous effectuerons une visite les deux jours suivants les procédures. Ensuite, ces points seront surveillés deux fois par semaine et consignés dans un cahier de suivi par l'expérimentateur pour permettre de limiter au minimum la douleur de l'animal. En cas d'atteinte des points limites, les animaux seront euthanasiés immédiatement. Aussi, les souris disposeront de fibres de peupliers leur permettant de construire un nid et ainsi améliorer leurs conditions d'hébergement.

10647 Exploration fonctionnelle du système visuel par Imagerie photonique et électrophysiologie chez le rongeur

- Contexte scientifique -

La vision est une entrée sensorielle majeure pour nos actions, la perception et la réalisation de diverses tâches cognitives. Cependant, le traitement de l'information visuelle est un réel défi car ce qui atteint le cerveau est souvent incomplet et ambigu. En plus, souvent la scène visuelle évolue en fonction du temps. Imaginons, par exemple, de devoir suivre du regard le vol d'une mouche pendant qu'il pleut. Une telle tâche, apparemment réalisée sans difficulté, nécessite une ségrégation entre le mouvement de l'animal et celle des gouttes d'eau, qui non seulement ressemblent à la cible mais aussi souvent la cachent à la vue. Pour résoudre ce problème, notre système visuel doit combiner les signaux sensoriels avec des connaissances préexistantes (innées ou accumulées avec l'expérience), par exemple, dans le cas mentionné, sur des caractéristiques plus ou moins probable du vol de mouche (vitesse, forme géométrique.). Depuis 50 ans, les neurosciences visuelles ont accumulé beaucoup de connaissances sur ces sujets, mais principalement sur la base d'étude de neurones individuels. Or il apparait clair que les traitements opérés par le système visuel sont distribués parmi des grandes populations de neurones en interaction dynamique. Pour comprendre ces traitements, il est donc nécessaire d'enregistrer d'un grand nombre de neurones.

- Objectifs -

Notre objectif est de mieux comprendre les opérations neuronales qui relèvent ces défis à l'échelle du neurone individuel, en passant par des petits groupes de cellules, jusqu'à une partie substantielle d'une ou de plusieurs aires corticales. Ceci nous permettra d'explorer les calculs dynamiques qui se déroulent au sein de différentes aires corticales visuelles et à différents niveaux (de l'activité neuronale au comportement). Pour ce faire, nous utiliserons le modèle rongeur (rat mais surtout souris) anesthésié ou éveillé, chez lequel nous enregistrerons l'activité neuronale à l'aide des dernières techniques disponibles. Celles-ci permettent de mesurer avec grande précision l'activité de grandes populations neuronales. Ces techniques sont l'imagerie optique à champ large et la microscopie multi-photonique, ou l'activité neuronale est transformée en signaux lumineux avant de les enregistrer par voie optique. Pour enregistrer directement l'activité électrique des neurones, nous utiliserons aussi des microélectrodes, en privilégiant aux modèles rigides (en verre, métal.) les modèles organiques car elles sont transparentes et, étant extrêmement flexibles, elles sont mieux tolérées par les tissus. Les enregistrements seront effectués dans le cortex visuel primaire et dans d'autres aires clés du cortex visuel.

- Règle des 3R -

REMPACER

Ce projet vise à mieux comprendre comment l'information visuelle est interprétée pour guider l'exploration visuelle et la construction des perceptions. Cela nécessite d'avoir accès à l'activité des "vrais" réseaux neuronaux (c'est à dire, chez des organismes vivants) avec une grande résolution spatio-temporelle. Pour l'instant, cela est impossible in-silico, in-vitro, et même in-vivo avec des

méthodes entièrement non-invasives. Nous utiliserons donc, in-vivo, une panoplie d'outils d'enregistrement nous permettant d'avoir accès à l'activité de population à l'échelle micro- et mésoscopique : la microscopie multi-photons, l'imagerie optique à champ large et des électrodes.

Nous nécessitons d'un modèle animal ayant un système visuel comparable à l'humain, sans avoir besoin d'un niveau de similitude typique du primate non humain, la présence d'un cortex visuel primaire (entré thalamique massive) étant suffisant. Cela permet de remplacer les primates par la souris et, quand une meilleure acuité visuelle est nécessaire, le rat. Certaines particularités de l'organisation fonctionnelle du cortex de ces animaux (p. ex. la sélectivité "sel-et-poivre" par rapport à l'orientation), sont d'ailleurs préférables pour certains aspects de notre projet. Nous travaillerons pendant 5 ans sur le rongeur : principalement la souris et, dans le cas qu'une meilleure acuité visuelle soit nécessaire, sur le rat.

REDUIRE

Quand ce sera possible, nous utiliserons des approches chroniques pour minimiser le nombre d'animaux :

- 1) Animal éveillée. Sur ces animaux nous enregistrerons l'activité cérébrale par (i) imagerie optique, (ii) électrodes (en majorité chroniquement implantées) et/ou (iii) microscopie multi-photons.
- 2) Dans le cas d'explorations fonctionnelles nécessitant un niveau réduit de bruit, nous utiliserons une préparation anesthésiée, en majorité chronique. Dans ce cas, afin de minimiser la probabilité de traumatismes physiques au cortex, les électrodes seront en place uniquement pendant l'enregistrement, qui sera effectué sous anesthésie, puis retirées.

Nos questions scientifiques portant sur des sujets encore largement inexplorés, l'amplitude et surtout la variabilité des effets recherchés ne sont connus que partiellement ou pas de tout, ce qui rend difficile d'évaluer précisément le nombre d'animaux nécessaires pour assurer la fiabilité statistique de notre étude. Nous avons donc estimé ce nombre en utilisant un algorithme d'estimation générale (« resource equation method ») qui nous a amené à des nombres typiques dans la littérature (chaque résultat est à reproduire, de façon incontestable, sur au moins une dizaine d'individus) : 1142 souris et 46 rats. Ces nombres seront affinés après la première année et communiqués au comité éthique en fonction des nouvelles informations acquises pendant le déroulement du projet. Notamment, ces nombres seront réduits dans le cas de résultats extrêmement probants ou au contraire disqualifiants, obtenus en cours du protocole expérimental.

RAFFINER

Les animaux seront hébergés dans cages enrichies (coton, rouleaux de carton), avec accès illimité à la nourriture et à l'eau. Ils seront vérifiés quotidiennement par des personnes compétentes, en utilisant les critères et notations d'une échelle standardisée d'interprétation des expressions faciales de l'animal, la « mouse (rat) grimace scale », intégrés avec des critères comportementaux standard, pour la détection de souffrance et sa comparaison avec les points limites. Protocoles, prémédication, anesthésie, analgésie, suivi et soins post-opératoires périodiquement discutés avec un vétérinaire ou un ingénieur d'étude en expérimentation animale, afin de les améliorer et les mettre à jour.

10648 Le cancer du col de l'utérus est la deuxième cause mondiale de mortalité chez la Femme due à un cancer. Dans la majorité des cas, une infection persistante causée par un Virus du Papillome Humain (VPH) est incriminée. En France, la vaccination préventive de l'adolescente, est une approche prophylactique récente qui permet d'éviter une première infection par les VPH à haut risque. Pour les femmes déjà infectées, des interventions chirurgicales sont pratiquées pour extraire les lésions cancéreuses. Un vaccin thérapeutique efficace pour ces femmes déjà infectées par un VPH de ce type constituerait une alternative qui permettrait à la fois de les soigner de manière non invasive mais également de minimiser les risques de rechute pour les femmes non vaccinées.

Notre projet vise à réaliser des études précliniques d'un vaccin thérapeutique candidat contre le cancer du col de l'utérus lié au VPH. Cependant, il n'existe pas de cancer du col de l'utérus lié au VPH chez l'animal. Les génomes humains et canins affichent une identité génétique élevée, et les études immunologiques canines se sont révélées être d'excellents modèles pour le système

humain. Des études préliminaires chez le chien en interne qui ont déjà fait l'objet d'autorisation éthique, nous ont permis d'avoir des données d'immunogénicité ainsi que d'innocuité de ce vaccin. De plus, d'autres études en interne chez la souris, qui ont également déjà fait l'objet d'autorisation éthique, nous ont permis de mettre au point les conditions optimales d'évaluation de l'efficacité thérapeutique vaccinale. Notre laboratoire souhaite donc désormais évaluer le vaccin candidat en termes d'efficacité chez le chien tel que développé chez la souris et afin de compléter les données d'immunogénicité ainsi que d'innocuité.

Pour limiter le nombre d'animaux testés, nous allons utiliser le nombre minimum d'animaux permettant de réaliser des études statistiques comparatives. Nous aurons besoin de 8 chiens au maximum pour cette étude. Les chiens sont observés quotidiennement par un zootechnicien ou un scientifique, vivent en groupe au sein des boxes enrichis au moyens de tablettes et sont sortis quotidiennement les jours ouvrés. Chaque chien a été acclimaté au chenil pendant 3 semaines avant le démarrage de l'étude. Aucune contrainte d'isolement n'est requise. Pour les vaccinations et prises de sang, aucune médication n'est prévue. Les études précédentes en interne chez la souris et chez le chien nous ont montré qu'aucun signe clinique n'était survenu. Toutes les incisions se feront sous tranquillisation en sous cutanée (Butorphanol 0.3 mg/kg : Dolorex et Acépromazine 0.01 mg/kg : Calmivet) et anesthésie locale (0.5 ml de lurocaïne * 4 points en intramusculaire autour de la zone à inciser). Un suivi post-opératoire de la douleur sera effectué le lendemain et quelques jours suivant les prélèvements de tissu afin de déterminer un score de douleur. Le suivi de douleur provient d'une grille multiparamétrique d'évaluation clinique de la douleur aiguë chez le chien selon l'association vétérinaire pour l'anesthésie et l'analgesie animales (4AVet). En fonction des résultats de ce suivi, la durée du suivi sera adaptée, un vétérinaire pourra être consulté et une médication sera apportée si nécessaire (anti-inflammatoires non stéroïdiens et/ou antibiotiques).

10649 L'hormone anti-Müllérienne (AMH) est une hormone produite par les cellules nourricières des testicules chez le mâle (cellules de Sertoli) et des ovaires chez la femelle (cellules de la granulosa), qui est essentielle pour le développement de ces organes. Le dosage de l'AMH est très utile en clinique. Chez les femmes en particulier, l'AMH est un marqueur des tumeurs de la granulosa et de la réserve ovarienne. Néanmoins, son rôle dans les gonades reste largement méconnu. Notre but est de comprendre son rôle physiologique chez la femelle et son mécanisme d'action dans les cellules de la granulosa de l'ovaire, d'étudier son implication dans les tumeurs de la granulosa et dans le syndrome des ovaires polykystiques une des principale causes d'infertilité féminine, et d'évaluer son potentiel thérapeutique éventuel. Un grand nombre d'études ont déjà été effectuées et seront poursuivies sur des lignées immortalisées de cellules de la granulosa normales et cancéreuses d'origine murine et humaine, dès lors qu'elles pourront remplacer les cultures primaires, et ceci afin réduire au maximum l'utilisation d'animaux. Néanmoins, comme ces lignées n'ont pas toutes les caractéristiques des cellules d'origine, des études *in vitro* sur des cultures primaires de cellules de la granulosa murines extraites d'ovaires et *in vivo* sur des souris témoins et transgéniques, sont nécessaires et complémentaires pour valider les résultats. Nous disposons de souris mutantes sécrétant de l'AMH de façon permanente ou au contraire n'en synthétisant pas. Pour étudier le rôle de l'AMH *in vivo* chez la femme des greffes de fragments d'ovaires humains sur des souris immunodéficientes (afin de limiter les phénomènes de rejet) que nous traiterons par de l'AMH seront effectuées. Ce type d'expérience permettra de tester aussi si l'AMH pourrait avoir un rôle protecteur, le temps de la mise en place d'une bonne vascularisation, chez les femmes dont un fragment d'ovaire a été greffé (après cryoconservation) afin de restaurer leur fertilité après un traitement anti-cancéreux. Enfin, l'effet anti-tumoral de l'AMH combiné ou non à celui de l'œstradiol sera étudié sur 2 modèles de tumeurs de la granulosa : des tumeurs provoquées par la greffe de cellules de la granulosa cancéreuses sur des souris, et des tumeurs du granulosa développé par différentes lignées de souris transgéniques.

L'utilisation d'un modèle animal est incontournable pour ces études pour plusieurs raisons : 1/La fonction ovarienne, que ce soit la croissance des follicules et leur capacité endocrine, est étroitement régulée par le complexe hypothalamo-hypophysaire. 2/ Les follicules ovariens comportent plusieurs types cellulaires qui dialoguent par l'intermédiaire de facteurs de croissance

et d'hormones dont le taux varie au cours du cycle sexuel, 3/ La croissance tumorale est régulée par de multiples paramètres au sein de l'organisme. Or il n'existe pas à ce jour de modèles *in vitro* permettant de restituer cette complexité. Le nombre d'animaux a été restreint tout en prenant en compte la nécessité d'en avoir un nombre suffisant pour la mise en évidence de différences statistiques entre les groupes traités ou mutants, et les groupes contrôles. Nous utiliserons des approches méthodologiques non dommageables pour l'animal avec le souci d'éviter la douleur (anesthésie, administration d'anti-douleurs) et les conditions d'hébergement seront enrichies avec des nids végétaux et des maisonnettes cartonnées. De plus, les animaux sont surveillés 2 à 3 fois par semaine par le responsable du projet ou les autres personnes habilitées à le faire. Un total de 667 souris maximum sera nécessaire pour ce projet.

10650 Depuis quelques années, un lien a été mis en évidence entre cancer et risque infectieux. Par exemple, il est désormais établi que l'infection par le papillomavirus est un facteur déterminant pour le développement du cancer du col de l'utérus, et la vaccination contre le papillomavirus est considérée comme un traitement préventif, réduisant le risque de cancer de col d'utérus chez la femme. Le lien entre infection et cancer peut impliquer différents mécanismes dont le plus probable consiste dans une altération des fonctions immunitaires induite par l'infection. Dans ce contexte, il est important de rappeler que des nombreux parasites ont un effet immunosuppresseur sur leurs hôtes et donc peuvent représenter un facteur de risque pour le développement de cancers. Dans ce projet, nous souhaitons étudier l'effet de l'infection par un nématode intestinal de rongeurs, connu pour avoir un effet anti-inflammatoire, sur la progression tumorale, dans un modèle de cancer du côlon, chez la souris. Nous utiliserons 44 souris femelles car elles peuvent être facilement maintenues en groupe, ce qui est important pour le bien-être d'une espèce sociale. Ces souris seront réparties en 4 groupes expérimentaux, avec 11 souris par groupe expérimental. Ce projet s'attache à respecter la règle des 3R. L'étude du rôle de l'infection sur la progression tumorale nécessite une approche *in vivo* car il n'est pas possible de reproduire la complexité des interactions entre réponse immunitaire, infection et prolifération tumorale *in vitro* (remplacer). Cependant, le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum avec 11 souris par groupe expérimental (réduire). Les conditions d'hébergement sont optimisées (groupes de 5 souris par cage avec enrichissement du milieu), et les animaux sont suivis quotidiennement afin de surveiller leur état de santé et des points limites sont définis (raffiner).

10651 Le cisplatine est une chimiothérapie couramment utilisée dans le traitement du cancer du côlon et du sein. Si son impact sur les cellules tumorales a été décrypté, celui sur les cellules du système immunitaire reste à déterminer. L'utilisation d'un modèle de tumeur mammaire spontanée permet d'être au plus près de la réalité du développement d'un cancer et nous permettra d'extrapoler les résultats obtenus chez l'homme de façon plus fiable. Dans ce modèle, les souris développent spontanément une tumeur mammaire après quelques semaines de vie puis des métastases quelques semaines plus tard.

L'impact de la chimiothérapie cisplatine sur le système immunitaire n'a pour l'instant jamais été étudié chez ce type de souris et cette étude devrait nous apporter des informations essentielles sur son rôle dans la modulation de la réponse anti-tumorale.

Pour réaliser cette étude, les souris seront traitées par cisplatine et euthanasiées 1 ou 7 jours après traitement par chimiothérapie. A l'issue de l'euthanasie les tumeurs, ganglions drainant la tumeur et les ganglions non drainants seront récupérés puis analysés par cytométrie en flux et par analyse ARN.

Cette étude nous permettra de mieux comprendre les mécanismes déclenchés par le cisplatine afin d'en exploiter les côtés positifs au maximum tout en minimisant les côtés négatifs de ce traitement.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront pas répétées plus de deux fois et les rates, les ganglions et les tumeurs seront analysés sur les mêmes animaux ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. De plus, nous avons fait appel à une méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants. Une partie

des résultats préliminaires a été réalisée *in vitro* (remplacement) mais la complexité d'un être vivant ne peut pas être mimée en laboratoire nécessitant l'utilisation de modèles murins. Enfin, la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections sous-cutanées des tumeurs et euthanasie) sera réalisée sous anesthésie permettant ainsi le raffinement de l'étude. Selon notre expérience, jusqu'au point limite (taille de la tumeur de 20mm sur sa plus grande dimension) aucune altération de la qualité de vie de la souris ne devrait être observée. Néanmoins, si une situation de souffrance est observée (posture, poils hérissés, comportement anormal) l'animal sera euthanasié par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane. Cette étude nécessitera 90 souris.

10652 La fréquence des maladies allergiques ne cesse de progresser depuis trente ans partout dans le monde et en particulier dans les pays industrialisés, aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte. Actuellement, les maladies allergiques occupent, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le quatrième rang parmi les maladies mondiales, posant ainsi un important problème de santé publique. Les allergies sont liées au développement d'une réponse immunitaire vis-à-vis d'antigènes (ou allergènes) chez un sujet déjà sensibilisé et il est reconnu que le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle dans le développement de ces maladies multifactorielles. A ce jour, il n'y a pas de traitement définitif de l'allergie. La prise en charge de l'allergie au quotidien reste basée sur l'éviction de l'allergène avec un impact très négatif sur la qualité de vie des enfants atteints et de leur famille (accès à la crèche, à la cantine, socialisation, appréhension constante d'une réaction anaphylactique.). En cas de manifestations cliniques, le traitement est médicamenteux.

Notre objectif est de comprendre les liens entre le microbiote intestinal et le développement des allergies afin de développer de nouvelles stratégies préventives et/ou curatives de ces maladies. Dans ce contexte, nous allons étudier l'impact de nouveaux probiotiques c'est à dire de « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé de l'hôte » dans un modèle d'allergie alimentaire, pour sélectionner ceux ayant des effets bénéfiques préventif et/ou curatif.

Ces probiotiques sont sélectionnés par des tests *in vitro* sur des modèles cellulaires en fonction de leurs propriétés immunomodulatrices. Les plus prometteurs seront testés chez la souris, modèle mimant le plus fidèlement possible la sensibilisation et la réaction allergique. Il est essentiel de passer sur un modèle *in vivo* pour tester un microbiote / probiotique qui est un système vivant complexe avec de multiples interactions avec l'hôte, notamment son système immunitaire. Cette étude nécessitera 1944 souris. Pour chaque souche et pour chaque modèle, nous utiliserons 18 souris: 12 souris seront sensibilisées et 6 souris ne seront pas sensibilisées. Ce nombre est le nombre minimal de souris à inclure par groupe compte tenu de la description du modèle pour avoir des résultats significatifs et les comparer entre eux.

Les souris seront tout d'abord colonisées avec des microbiotes d'enfants sains ou d'enfants allergiques. Après cette implantation de microbiote, les souris seront sensibilisées (souris tests) ou non (souris contrôles) avec un allergène alimentaire (protéines du lait de vache). Cette sensibilisation sera réalisée une fois par semaine pendant 5 semaines. Les souris recevront un probiotique en traitement préventif ou curatif. L'allergie à la protéine du lait sera évaluée par l'administration directe de l'allergène. Les souris seront euthanasiées à la fin de l'étude pour prélever des organes (intestins, rate, ganglions et sang) afin d'étudier l'impact de l'administration des probiotiques sur la réponse immunitaire.

Le traitement curatif ne sera étudié que sur les probiotiques qui auront montré un effet bénéfique en traitement préventif.

Bien que les animaux ne soient pas malades lors de l'implantation du microbiote, ni au cours des 5 semaines de sensibilisation, une surveillance quotidienne sera réalisée. Lors du déclenchement de la réaction allergique, les souris seront surveillées suivant des grilles pré-établies. Des points-limites ont été établis qui entraînent l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, cette étude permettra de mieux comprendre la relation microbiote-allergie et de sélectionner des probiotiques avec des effets bénéfiques sur l'allergie.

10653 Les paragangliomes sont des tumeurs rares. Le plus souvent bénignes, elles sont cancéreuses dans 15% des cas. Dans 40% des cas, ces tumeurs sont héréditaires c'est-à-dire que les patients sont porteurs d'une anomalie génétique (la mutation d'un gène) qui leur confère un risque fortement augmenté de développer ce type de tumeurs par rapport à la population générale. Dans ces cas, les patients sont souvent atteints de tumeurs multiples, et dans le cas de certaines mutations particulières, de tumeurs malignes (des cancers) et de mauvais pronostic. Les options thérapeutiques actuelles sont limitées et peu efficaces, rendant indispensable le développement de nouvelles thérapies à tester dans un premier temps chez la souris (phase préclinique) et le développement d'outils d'imagerie pour suivre l'efficacité de ces traitements.

Notre objectif consiste donc à établir des modèles murins de ces tumeurs afin de comprendre les mécanismes impliqués dans leur développement cancéreux, d'évaluer des cibles thérapeutiques innovantes et d'identifier des critères de réponse précoce à ces traitements, notamment par imagerie. Nous réaliserons des greffes de cellules tumorales chez la souris : soit, sous la peau (sous-cutané), soit dans le rein, la rate, le cœur ou la circulation sanguine (pour générer des modèles métastatiques). Pour cela nous effectuerons les chirurgies sous anesthésie générale avec administration d'antidouleur. Une fois les modèles murins établis, nous les utiliserons pour tester l'efficacité anti-cancéreuse de quatre thérapies candidates. Nous testerons ces traitements sur des souris en les comparant à chaque fois à un groupe contrôle ne recevant que le placebo. Avant et durant le traitement, les tumeurs seront mesurées et des imageries seront réalisées de façon hebdomadaire. A la fin du traitement, nous analyserons la tumeur afin de rechercher les mécanismes de réponse ou de résistance aux traitements.

Au total, 2860 animaux seront utilisés sur 5 ans pour ce projet afin de permettre une analyse statistique fiable des résultats.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. Lors des procédures une surveillance journalière sera mise en place afin de réduire au maximum la souffrance et l'anxiété des animaux (anesthésie, analgésiques et antibiotiques seront administrés afin de soulager la douleur et d'éviter d'éventuelles infections post-chirurgicales). Pour chaque procédure des points limites ont été établis, entraînant l'exclusion de l'animal du protocole et son euthanasie anticipée. Une période de récupération sera prévue entre chaque séquence de procédure.

Les souris seront suivies sur une période pouvant aller jusqu'à 18 mois après la greffe en fonction du développement tumoral observé (qui peut être très lent dans ces modèles).

Ce projet permettra de démontrer l'efficacité des nouvelles thérapies ciblées pour traiter ces tumeurs qui répondent très mal aux chimiothérapies classiques et de développer une nouvelle méthode non invasive par imagerie pour détecter la réponse précoce à ces nouvelles thérapies.

10654 Les recherches empiriques en écologie et biologie de la conservation animale impliquent d'avoir recours à l'utilisation d'animaux sauvages, dans leur habitat naturel, à fins scientifiques. Une part de ces recherches impose de les capturer et les contenir temporairement captifs, ce qui induit un stress inévitable. Tout l'enjeu de la protection des animaux sauvages utilisés à fins scientifiques est de savoir gérer simultanément ce stress inévitable et les risques liés aux gestes expérimentaux à appliquer.

Les personnels devant utiliser des animaux de la faune sauvage non-hébergée à fins scientifiques doivent donc suivre une formation spécifique obligatoire, qui leur apporte simultanément les bonnes pratiques de suivi et de gestion (1) du stress des animaux, et (2) des risques associés aux gestes à pratiquer. Ces deux compétences ne peuvent pas être enseignées (i) sans pratique : le recours à des démonstrations sur des animaux vivants est inévitable, (ii) sur des animaux d'origine captive : ces derniers ne stressent pas comme les animaux sauvages car ils sont adaptés et acclimatés à l'Homme, avec un stress en réponse à la capture et la manipulation atténué. Les animaux sauvages

ont une réaction au stress 'adaptative' (cf. réponse d'évitement de la prédation) qui doit être évaluée, contenue, et prise en compte en permanence de la conception à la mise en œuvre procédures (en particulier pour l'anesthésie).

Une formation spécifique adaptée à l'utilisation d'animaux de la faune sauvage non-hébergée à fins scientifiques a donc été créée, et agréée par l'autorité compétente en 2015, avec mise en œuvre sur des espèces de faune sauvage non-hébergée. La présente demande d'autorisation de projet concerne donc l'utilisation d'animaux sauvages à fins pédagogiques pour les démonstrations (Démos) du module complémentaire spécifique de cette formation. Le fondement pédagogique est que les apprenants soient formés aux gestes les plus courants sur un modèle animal le plus proche possible des leurs. Les personnes pourront donc suivre les Démos sur reptiles (8 espèces), petits oiseaux (5 espèces), grands oiseaux (4 espèces), petits mammifères (6 espèces), ou grands mammifères (2 espèces). Ces 25 espèces ont été choisies car elles sont régulièrement utilisées en écologie, et communes et abondantes localement. Nous disposons des dérogations de capture d'animaux sauvages nécessaires. En cas d'imprévu logistique (échec de capture), nous aurons recours à des espèces d'origine captive, disponibles à proximité, pour assurer la mise en œuvre des Démos.

La formation repose sur 4 Démos, chacune correspondant à une procédure considérée de gravité légère :

Démo1 - Méthodes expérimentales faiblement invasives, incluant le marquage hypodermique, les prélèvements sanguins complexes (phlébotomie, intra-cardiaque), et la mesure de consommation d'oxygène.

Démo2 - Méthodes d'anesthésie par injection ou par inhalation (niveau visé : stade III léger, pour les chirurgies légères).

Démo3 - Reconnaissance de signes de détresse chez l'animal sauvage induits par la captivité temporaire, l'anesthésie (réveil) et/ou le marquage électronique ;

Démo4- Examen d'hygiène et santé animale, incluant des prélèvements sanguins.

Ces quatre Démos sont réalisées sur les 5 groupes taxonomiques, ce qui fait un total de 20 procédures. Le nombre total d'animaux utilisé en procédure par session sera de 6 individus par groupe taxonomique (2 pour Démo1 ; 2 pour Démo2 et 3 ; 2 pour Démo4). En traitant 4 groupes taxonomiques par session de formation, 3 sessions par an, pendant 5 ans, cela fera au maximum 360 individus utilisés pour 300 apprenants formés.

Application des 3Rs à la formation.

Remplacer : L'enjeu pédagogique des Démos est de (dé)montrer aux apprenants l'intérêt de méthodes et pratiques alternatives aux pratiques communes (Raffinement), et le cas échéant, leur préconiser des formations par tutorat complémentaires pour finaliser leur acquisition de l'autonomie technique des bonnes pratiques. Les Démos dans des conditions réalistes (sur animaux sauvages en nature) sont donc indispensables pour atteindre ces objectifs pédagogiques. Ces enseignements pratiques ne peuvent pas être délivrés sur des modèles *in silico* ou *ex vivo*, à l'exception de l'euthanasie qui sera enseignée par des films et la pratique sur des cadavres (cf. Réduction).

Réduire : Le nombre d'individus utilisés a été réduit au maximum $N = 2$ par Démo et par groupe taxonomique). Les individus de la Démo2 seront réutilisés dans la Démo3. La majorité des individus utilisés en Démo font également partie de projets de recherche en cours, et sont donc mutualisés entre projets. Enfin, les manipulations seront filmées pour enrichir la formation en supports pédagogiques sans augmenter le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner. L'enjeu pédagogique est donc le raffinement : évaluer et minimiser le stress des animaux sauvages pendant les procédures. C'est la trame transversale à tous les Démos. Les formateurs ont été choisis parmi les personnes les plus expérimentées en France sur ces groupes. Les responsables de Démos enseigneront la pratique sûre et rapide de gestes techniques courants, avec minimisation du temps de stress. En cas d'individu risquant d'atteindre un état de stress pathologique (points limites), il sera immédiatement mis au calme sous surveillance (quelques minutes), puis relâché au plus vite sur son lieu de capture. La mise en captivité temporaire sera

associée à des mesures de réduction du stress (obstruction visuelle, abris). La douleur ponctuelle induite par les implantations sera prévenue ou compensée par l'administration d'anesthésique local. Le vétérinaire référent décidera du traitement à apporter à tout individu blessé ou en état de stress avancé.

En résumé, l'utilisation d'animaux sauvages pour les Démonstrations est inévitable. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum. Ils ne seront exposés qu'à des gestes de gravité légère, pendant des temps très courts (quelques minutes à heures). Le but pédagogique est le raffinement des pratiques, en particulier la gestion du stress des animaux sauvages pendant leur utilisation. Ils seront tous relâchés sur leur lieu de capture, avec leurs marques afin de ne pas être réutilisés, et ils sont majoritairement intégrés à des projets de recherche en cours. Aucune euthanasie ne sera réalisée à fins pédagogiques.

10655 Chez l'homme, l'hyperactivité détroisurienne est définie par l'International Continence Society comme étant « la constatation urodynamique de contractions détroisuriennes involontaires pendant la phase de remplissage vésical, qui peuvent être spontanées ou provoquées ». On distingue deux types d'hyperactivité détroisurienne (HD) selon le facteur étiopathogénique en cause (1) idiopathique (aucune cause définie n'est suspectée) ; ou (2) neurogène (HDN) quand il existe une cause neurologique identifiée (traumatisme médullaire etc.). La prise en charge médicale des patients est financièrement très lourde notamment suite aux complications urologiques (incontinence), modifications urodynamiques, infections urinaires ou insuffisance rénale chronique. Ces complications sont les premières causes de réhospitalisation et affectent la qualité de vie et la morbidité des patients. La prévalence élevée, les conséquences psychosociales et les coûts relatifs à la prise en charge médicale font de ce syndrome un réel problème de santé publique.

Le bon fonctionnement du bas appareil urinaire impose l'intégrité du système nerveux central et périphérique, somatique et neurovégétatif. C'est à cette seule condition que la motricité vésico-sphinctérienne peut assurer l'alternance des phases de remplissage (continence) et de vidange (miction), par des phénomènes d'activation et de désactivation de fibres musculaires des différentes structures anatomiques. Malgré les avancées médicales et chirurgicales, les traitements actuels pour cette pathologie et ses complications sont limités. L'association antimuscariniques/cathétérismes vésicaux intermittents est le traitement de première intention de l'HDN. L'efficacité de cette prise en charge est limitée et les effets secondaires des antimuscariniques peuvent altérer l'observance du traitement. En deuxième intention, l'injection intradétroisurienne de toxine botulique A est désormais souvent proposée. Toutefois, l'efficacité à long terme de la toxine botulique dans cette indication n'est pas connue et le caractère invasif de sa délivrance est certain.

Il est donc nécessaire de conduire une recherche visant à une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'HDN et la réalisation de tests précliniques sur un modèle animal fiable, pour permettre le développement de traitements pharmacologiques innovants, tout en optimisant leur efficacité et en limitant leurs effets secondaires.

Il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* permettant l'étude de cette pathologie (remplacement) définie par des symptômes et donc difficile à appréhender hors d'une situation physiologique. Dans ce contexte, le modèle préclinique le plus pertinent qui présente des caractéristiques similaires à celles observées dans la pathologie humaine est le rat ayant subi une transection de la moelle épinière (SCI). De plus, il est également envisagé de pouvoir comparer les résultats obtenus chez les rats SCI pour l'étude de l'HDN, à un modèle présentant une hyperactivité détroisurienne d'origine idiopathique par l'étude de rats spontanément hypertendus.

Les études pharmacologiques menées sur ce modèle conduiront à l'utilisation de 900 rats femelles sur 5 ans. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum nécessaire (réduction) pour réaliser des statistiques acceptables (12 rats par groupe de traitement), du fait des connaissances et de l'expérience du personnel participant au projet et des procédures liées. Un suivi quotidien de l'état général et du poids des animaux est réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal, de plus des points limites sont définis. De plus, ces animaux présentent un trouble

mictionnel qui nécessite un change adapté : augmentation de la fréquence, augmentation de la quantité de litière (raffinement).

10656 But du projet : recherche appliquée et translationnelle

Le liquide cébrospinal (LCS) dans lequel baigne le système nerveux central (SNC) constitue un système de protection mécanique contre les chocs. Circulant dans les espaces périvasculaires intra-cérébraux, il constitue donc également un système de transport véhiculant des nutriments vers le cerveau et des déchets en dehors du cerveau. Ce système de drainage est désigné, système glymphatique. De fait le plexus choroïde, la principale structure productrice du LCS, pourrait être un centre névralgique de contrôle des échanges entre le sang et le cerveau, et pourrait constituer une porte d'entrée de médiateurs clés lors d'atteintes du SNC.

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une protéase clé du système fibrinolytique sanguin, propriété copiée par l'industrie pharmaceutique, qui produit une forme recombinante du tPA (rtPA). Ce rtPA est le traitement de référence pour les accidents vasculaires cérébraux ischémiques, mais est aussi intéressant pour le drainage des hémorragies sous-arachnoïdiennes. Injecté par voie intraveineuse afin de lyser le caillot sanguin, le rtPA peut toutefois se retrouver dans le parenchyme cérébral, et exercer une action pro-neurotoxique. Il est donc important, pour optimiser la prise en charge des patients, de comprendre comment le rtPA passe du compartiment vasculaire vers le compartiment parenchymateux, pour développer des stratégies thérapeutiques limitant cet échange. Les expériences menées *in vitro* suggèrent que le rtPA vasculaire puisse passer dans le LCS via le plexus choroïde, ceci par un mécanisme actif spécifique d'un récepteur. Nous voulons maintenant valider ces observations chez la souris, afin de proposer une stratégie thérapeutique pour améliorer le bénéfice aux patients traités par le rtPA.

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

Nous avons souscrit au principe de remplacement en sélectionnant le modèle présentant le meilleur compromis entre une haute pertinence et une faible sensibilité. La souris est l'espèce animale dont le système glymphatique a été le plus étudié. Les mécanismes en sont donc globalement établis, ce qui nous permettra d'interpréter nos résultats de manière fiable. L'ensemble des acquis et des connaissances dont nous disposons rend cette espèce particulièrement intéressante dans le cadre de notre étude.

Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux afin de souscrire au principe de réduction. 116 souris seront nécessaires pour explorer les différents passages inter-compartiments.

Afin de souscrire au principe de raffinement, les animaux seront anesthésiés durant chaque procédure. La douleur suite à une injection intraveineuse, intracisternale ou intraparenchymateuse est considérée comme légère à modérée : en effet l'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire montre que les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun « sickness behavior syndrom ».

Le bien-être des animaux sera suivi par du personnel formé bi-quotidiennement 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à l'euthanasie de l'animal.

10657 En France, le cancer de la prostate représente la 2ème cause de mortalité par cancer chez l'homme (11 % des décès par cancer) ce qui le classe au 1er rang des priorités thérapeutiques. Dans certains cas des cancers de la prostate, certaines mutations peuvent affecter le récepteur des androgènes. Le récepteur reste alors actif (c'est à dire qu'il régule ses gènes cibles), même en absence d'hormone (cancers de la prostate hormono-indépendants).

Une des nouvelles pistes dans le développement de nouvelles molécules anti-cancéreuses, est ce qu'on appelle l'ARN interférence. Cette stratégie thérapeutique consiste à synthétiser des petite

molécules (siRNA) qui vont empêcher spécifiquement l'expression de certains gènes cibles. Ici, nous allons tester deux siRNA ciblant le récepteur aux androgènes (siAR) ainsi qu'un siRNA ciblant la thrombospondine-1 (siTSP-1), protéine hautement exprimée lors des cancers résistants à la castration (siTSP-1). Cette étude a pour but de tester les effets anti-tumoraux de ces deux siRNA, seuls et en combinaison, afin de mettre en avant un éventuel effet synergique de ces deux médicaments. De manière intéressante, chacun des siRNA seul ont déjà montré des effets dans le modèle que l'on se propose d'utiliser.

L'utilisation d'animaux est nécessaire pour mettre en évidence les effets anti-tumoraux d'une molécule destinée à être utilisée dans le traitement contre le cancer chez l'Homme. Pour ce projet, nous utiliserons 60 souris nude mâles. Ce nombre a été déterminé de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux tout en conservant la validité statistique de l'étude, tant sur la croissance tumorale que sur les analyses immunohistochimiques qui pourront suivre. En effet, le taux de prise de la greffe est de 80% d'après de précédentes expériences menées. Nous avons décidé de mener l'étude complète et d'étudier plusieurs nouvelles molécules en parallèle afin de ne pas avoir à multiplier les groupes placebo, permettant ainsi une diminution du nombre d'animaux utilisés.

Nos petites molécules d'ARN seront administrées via un système de pompes placées en sous-cutanée. La pose de ce matériel sera faite sous anesthésie après administration d'un analgésique, lequel sera renouvelé toutes les 24h pendant 48h. La démarche de traiter via une administration continue sous-cutanée permet de s'affranchir d'une injection quotidienne chez les animaux (améliorant ainsi leur bien-être selon la règle des 3 R - Raffiner) et sera plus confortable qu'une administration intrapéritonéale pour le patient lors du développement clinique. Cette administration a déjà montré son efficacité dans une étude précédente.

Le projet n'inclut pas de procédures douloureuses et les greffes n'induiront pas de douleur au cours du temps mais pour s'en assurer, les animaux seront observés 5 fois par semaine. Différents points limites seront particulièrement surveillés tels : perte de poids, gêne pour se déplacer, développement tumoral trop important, tumeur devenant nécrotique (la nécrose étant facilement observable avec l'apparition d'une ulcération centrale de la tumeur qui progresse rapidement une fois présente). Le comportement et l'apparence physique feront aussi l'objet d'observations. Les dispositions retenues pour stopper ou atténuer les problèmes liés à l'apparition de points limites seront prises dès constatation. Un tableau listant les points, les scores associés à ces points et les dispositions à prendre sera établi. Les souris seront hébergées en armoire ventilée avec une alimentation de reproduction enrichie en protéines et lipides et eau à volonté. Elles disposeront d'un enrichissement leur permettant nidification et fouissage. Cycles jour/nuit : 12/12h, Température : 20°/24°C.

10658 Le traitement des pertes de substance mandibulaires segmentaires demeure un problème de santé publique. En France, la principale cause des pertes de substances segmentaire de la mandibule est la chirurgie d'exérèse carcinologique. 500 000 nouveaux cas de cancers des Voies Aéro-Digestives Supérieure sont diagnostiqués chaque année dans le monde. En France, ces cancers représentent 15 000 nouveaux cas par an chez l'homme et 2 000 nouveaux cas par an chez la femme. Si une résection interruptrice de la mandibule est nécessaire, une reconstruction mandibulaire est envisagée pour faciliter la mastication, maintenir la statique des muscles du plancher buccal et de la langue, faciliter la déglutition et conserver l'esthétique. La reconstruction repose le plus souvent sur le lambeau libre de fibula, mais ce lambeau présente l'inconvénient du temps opératoire et d'un nombre d'échec non négligeable. Plus récemment, le traitement des pertes de substances osseuses segmentaires mandibulaires par la technique de la membrane induite a été étudié. Il s'agit d'une technique en 2 temps combinant l'induction d'une membrane induite in situ et une greffe osseuse. Mais des études précédentes menées au sein de l'unité ont montré que la membrane induite présentait des limites liées à son absence de pouvoir ostéoinducteur (absence de cellules ostéoprogénitrices et faible quantité de facteurs de croissance) et à la nécessité d'un deuxième temps opératoire. La membrane amniotique humaine (MAH) est la partie la plus interne du placenta. Cette membrane pourrait être une alternative à la membrane induite en cancérologie du fait de ses propriétés biologiques et mécaniques. Il s'agit d'un tissu abondant dont l'obtention est

simple car il s'agit d'un déchet opératoire. De plus, la MAH a des propriétés anti-tumorales. Les travaux menés dans l'unité ont démontré que la membrane amniotique cryopréservée améliorerait la régénération osseuse de défauts de calvaria de souris.

Par ailleurs, la membrane amniotique pourrait remplacer avantageusement la membrane induite car elle ne nécessite pas de deuxième temps opératoire et elle contient des facteurs de croissance qui pourraient favoriser la cicatrisation osseuse. Le but de ce projet est i) d'étudier l'apport de la membrane amniotique lyophilisée ou décellularisée et lyophilisée pour la réparation de perte de substance osseuse segmentaire, et ii) de comparer ce potentiel de réparation à celui de la membrane induite. L'étude sera réalisée chez 20 rats Wistar RjHan adultes. Un défaut segmentaire de taille critique de 5 mm sera réalisé sur chaque fémur. La réparation osseuse sera étudiée via 4 conditions : 1) témoin négatif vide, 2) réparation en présence d'un biomatériau seul, 3) biomatériau et membrane induite et 4) Biomatériau et membrane amniotique. Les animaux seront euthanasiés 12 semaines après l'implantation du biomatériau. La réparation osseuse sera analysée par imagerie 3D ainsi que par analyse histologique. L'achat récent d'un micro scanner *in vivo* permettra d'effectuer un suivi longitudinal des animaux sans avoir besoin d'en euthanasier (réduction). Les informations recueillies grâce à cette méthode non invasive seront complétées par une analyse histologique des tissus prélevés après euthanasie des animaux. Remplacement : Il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant d'étudier la réparation osseuse dans ce contexte. Réduction : ces expériences sont conçues pour limiter le nombre d'animaux à 10 pour chacune des 4 conditions expérimentales, en utilisant des tailles de groupes basées sur des travaux antérieurs. De plus, les méthodes d'imagerie utilisées permettent de réduire significativement le nombre d'animaux, pour le suivi de la formation osseuse. Raffinement : Une analgésie adaptée (PAR Buprénorphine) sera appliquée en pré- et post-opératoire. Les rats seront maintenus en fratrie (4 par cage) avec des conditions d'hébergement et un milieu d'enrichissement adaptés (tunnels en polycarbonate), favorables au bien-être de l'animal. Les animaux seront surveillés par le personnel de l'animalerie et par des responsables de la manipulation tous les jours.

10659 L'identification de gènes impliqués dans le développement musculaire présente des applications tant en élevage qu'en santé animale et humaine. Elle permet en effet de rechercher dans les populations d'animaux de rente les gènes favorables pour un développement musculaire optimal. Elle ouvre également des perspectives de nouveaux traitements thérapeutiques pour régénérer une croissance musculaire suite à certains traumatismes ou dans le cas de pathologies génétiques.

Le gène étudié dans le présent projet a été identifié suite à une série d'études menées avec des cultures de cellules de muscle de souris (lignée cellulaire C2C12) et leur invalidation est associée à une prolifération plus importante des cellules et/ou une augmentation de leur volume. Cette première étape était donc essentielle et participe au principe de réduction car elle a permis de sélectionner ces deux gènes d'intérêt sans utiliser d'animaux. Le but du projet est de confirmer cet effet *in vivo*, par l'analyse de souris transgéniques invalidées pour ce gène, et de rechercher d'autres effets éventuels sur d'autres tissus. Le choix de la souris est justifié par i) son métabolisme musculaire proche de celui des animaux de rente et de l'homme, ii) la bonne connaissance de la génétique de cette espèce et l'abondance d'outils pour son étude, iii) ses caractéristiques de reproduction avec une forte prolificité associée à un faible intervalle de génération et iv) l'efficacité des outils disponibles pour éditer son génome. La méthode envisagée permet de limiter le nombre d'animaux en expérimentation, par des croisements raisonnés permettant l'obtention conjointe des souris invalidées et de leurs contrôles.

Les principaux caractères analysés, sur deux lignées indépendantes invalidées pour le gène d'intérêt et la lignée contrôle, seront : Mise en place des lignées (70 souris), l'analyse du poids, des paramètres biochimiques et du phénotype musculaire de la naissance à 6 mois (210 souris), l'étude de la mise en place du tissu musculaire au stade embryonnaire et fœtal (20 souris), l'étude de la capacité de régénération musculaire suite à une lésion musculaire induite (144 souris) et enfin, la mise en place d'une culture de cellules souches musculaires (45 souris). Ainsi, 489 souris seront nécessaires pour l'ensemble du projet sur une durée de 5 ans, incluant les animaux utilisés pour la cryopréservation des lignées.

Dans un souci de respect de la règle des 3R, les animaux utilisés pour les prélèvements sanguins seront également utilisés pour les prélèvements post-mortem d'échantillons musculaires. De plus, la mise en place d'une culture primaire permettra des études moléculaires limitant l'utilisation du modèle *in vivo*.

Cette étude permettra de mieux comprendre les voies métaboliques impliquées et d'appréhender les voies thérapeutiques envisageables. Les souris bénéficieront dans chaque cage d'un enrichissement de leur milieu (rouleau en carton, coton dentaire, morceau de bois). Les animaux seront en groupe pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement. Cela permet d'intervenir rapidement et de manière appropriée si un problème était constaté. Ce projet, mené en collaboration entre différents laboratoires, a été approuvé par l'évaluation HCERES.

10660 Le traitement de l'information sensorielle par le cerveau implique un couplage étroit entre les populations de neurones excitateurs et inhibiteurs. Les neurones excitateurs du cerveau forment généralement de longues projections et peuvent influencer des aires cérébrales distantes, alors que les neurones inhibiteurs forment des connexions plutôt locales. Les populations neuronales inhibitrices sont très diverses et façonnent les propriétés locales des réseaux neuronaux. Des déficits touchant les interneurons du cerveau sont associés à de nombreuses pathologies psychiatriques telles que l'épilepsie, le retard mental, la schizophrénie ou encore les maladies du spectre autistique. Il est donc indispensable d'identifier et mieux caractériser les populations neuronales inhibitrices afin de mieux comprendre la fonction des circuits neuronaux cérébraux. Cependant, le nombre de populations d'interneurones a été largement sous-estimé et les connaissances sur leur développement et leur insertion dans les circuits cérébraux restent incomplètes.

Dans le système auditif, un déficit de l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition neuronales a des conséquences délétères. Plus particulièrement, la compréhension de la parole ou le traitement de l'information sonore en milieu bruyant (effet cocktail party) sont touchés au cours du vieillissement ou à la suite de traumatismes sonores, deux processus entraînant un déséquilibre entre l'excitation et l'inhibition neuronales au détriment de l'inhibition. Il est donc essentiel de déterminer par quels mécanismes de plasticité cet équilibre entre l'excitation et l'inhibition neuronales s'établit au cours du développement dans le cortex auditif.

L'objectif du projet est d'identifier et de caractériser les populations neuronales qui constituent le cortex auditif, c'est-à-dire la substance grise du cerveau. Pour ce faire, nous prenons comme point de départ des lignées de souris génétiquement modifiées pour un gène donné et qui présentent une susceptibilité aux crises audiogènes, des crises de type épileptique dites réflexes qui sont induites uniquement par un son de forte intensité. Cette susceptibilité aux crises audiogènes est une manifestation d'un défaut de l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition neuronales dans les aires auditives et indique que le gène muté est impliqué dans le développement des populations neuronales du système auditif. Nous avons déjà identifié 5 de ces gènes potentiellement impliqués dans le développement des réseaux neuronaux du système auditif. L'étude des deux premiers d'entre eux a permis de mettre au jour une population de neurones inhibiteurs spécifique du cortex auditif. Chacun de ces gènes de susceptibilité aux crises audiogènes offre potentiellement un point d'entrée moléculaire afin de caractériser les fonctions des différentes populations neuronales qui constituent la partie auditive du cerveau.

Le projet impliquera une équipe composée de 6-8 chercheurs et comporte huit procédures. Les procédures expérimentales décrites visent à identifier de nouveaux gènes de susceptibilité aux crises audiogènes et à caractériser la fonction des populations neuronales nouvellement identifiées. Cette caractérisation comporte un volet anatomique par immunohistochimie, fonctionnel par électrophysiologie, et comportemental.

Les gènes responsables de surdité chez l'homme sont aussi responsables de déficits auditifs chez la souris, et l'architecture des systèmes auditifs périphérique et central de rongeurs, similaire à celle de l'homme, permet d'étudier chez ces animaux l'audition. Aujourd'hui, il n'existe aucune alternative à l'expérimentation animale, car nous avons besoin d'étudier le système auditif dans son ensemble

(de l'oreille interne au cortex auditif). Il n'est pas possible aujourd'hui de mettre en culture les systèmes auditifs périphériques et centraux. De plus, aucun modèle informatique n'existe pour simuler le fonctionnement du système auditif dans son ensemble.

Ce projet de cinq années impliquera un total de 9112 souris de laboratoire élevées et hébergées dans les conditions optimales. Parmi celles-ci, 8192 souris entreront dans des procédures légères, et 920 dans des procédures modérées. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les animaux seront systématiquement génotypés, les mâles et les femelles seront utilisés sans distinction. Des méthodes d'analyse statistique sont utilisées afin de déterminer la taille optimale des groupes expérimentaux pour répondre aux questions scientifiques. Les animaux impliqués dans le projet seront suivis quotidiennement et seront anesthésiés, lorsque c'est nécessaire, pour éviter toute forme de souffrance.

Ce projet permettra une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du cortex auditif. Il pourrait ouvrir la voie au développement de meilleurs méthodes de réhabilitation auditive pour les personnes appareillées à la suite d'une surdité.

10661 Bien que le développement de la laparoscopie ait réduit le traumatisme et l'agressivité chirurgicale, la dissection laparoscopique peut être limitée par la disponibilité ou l'existence d'instrumentation appropriée. De même, le bénéfice de la chirurgie laparoscopique peut être amélioré par la capacité de disséquer rapidement les tissus. Jusqu'à présent, peu d'instruments laparoscopiques reproduisent la dissection réalisée par le doigt non-traumatisant du chirurgien. Généralement, les plans et tissus sont lentement disséqués à l'aide de pinces et de ciseaux. Ceci expose au risque de saignement ou de lésions viscérales. L'aqua-dissection a été développée pour réaliser une dissection atraumatique des plans et tissus, en utilisant du liquide sous pression à une ou plusieurs atmosphères. Cet instrument a l'inconvénient de laisser du liquide libre dans le champ opératoire et de provoquer une infiltration œdémateuse des tissus adipeux. Récemment, nous avons mis au point un instrument laparoscopique de 5 mm capable de délivrer de façon contrôlée, du dioxyde de carbone à haute pression ; cet instrument, le Pneumo-dissecteur, permet au chirurgien de disséquer les plans et tissus sans endommager les vaisseaux et organes environnants. En revanche l'utilisation de ce matériel expose à un risque théorique d'embolie gazeuse, en particulier lié à l'utilisation de dioxyde de carbone en condition laparoscopique. L'objectif principal de ce travail de recherche est d'évaluer l'innocuité de ce dispositif chirurgical.

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

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

- Le modèle animal a été réservé à la mise en situation complexe, la totalité des paramètres modélisables l'ayant été par des mesures sur banc d'essai. Le modèle animal de grande taille permettra, dans des conditions identiques à la pratique humaine, de combiner un très grand nombre de données physiologiques.

- Il s'agit de procédures pour lesquelles une anesthésie et une analgésie profondes et adaptées sont utilisées. La souffrance animale est donc réduite au maximum. Les animaux sont stabulés au maximum 5 jours en amont de ces procédures, dans un milieu enrichi comme exigé par la réglementation animale (balle, cordes, jouets spécifiques non dangereux notamment du risque d'inhalation et/ou d'ingestion.).

- Le nombre total d'animaux est limité à douze (deux groupes de six) le minimum pour obtenir des données significatives en utilisant un test non paramétrique païré de Wilcoxon.

10662 Ce projet a pour objectif d'évaluer l'innocuité et la sécurité de vaccins viraux vivants atténués destinés à l'homme.

Ce projet consiste à administrer des dilutions d'un vaccin à des souris, les héberger pendant une durée adaptée pour observer l'absence de symptômes cliniques ou certains symptômes cliniques modérés par rapport à un vaccin témoin de référence.

Ce test répond aux exigences de la réglementation pour assurer et documenter le maintien de l'atténuation au cours de la multiplication virale lors de la production des vaccins. Ce test comprend également la formation / qualification du personnel à ce test, comme requis par la réglementation.

L'ensemble de ce projet peut nécessiter l'utilisation de 4000 souris sur une période de 5 ans (basée sur une évaluation des besoins actuels).

Les bénéfices attendus sont :

- de contribuer à la libération des lots de vaccins conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur.
- d'assurer le niveau de formation / qualification du personnel conformément à la réglementation.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Un développement de modèles *in vitro* est en cours chez le fabricant du vaccin, avec l'étude de la réplication des souches virales atténuées en comparaison de souches témoins sur différents modèles cellulaires. En attendant la validation de ce modèle, l'utilisation d'animaux est requise par la réglementation.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés au total est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins des procédures expérimentales sur une période de 5 ans. Le testing de lots sont regroupés de façon à mutualiser les animaux références et témoins.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés en groupe dans des locaux appropriés et dans des cages contenant des enrichissements conformément aux standards réglementaires en vigueur.

Les animaux sont anesthésiés selon les procédures en vigueur avant administration du vaccin. Ces animaux sont suivis par un personnel spécifiquement formé. Les animaux sont observés quotidiennement en vue de détecter le plus précocement possible l'apparition de signes cliniques caractéristiques du mode d'action du virus étudié. Des points limites spécifiques sont établis afin de préserver le bien-être des animaux.

Pour soutenir les animaux, des gels hydratants avec ou sans aliments pourront être rajoutés dans les cages des animaux afin qu'ils puissent se nourrir plus facilement.

10663 La cachexie associée au cancer ou au sepsis (syndrome d'infection générale et grave de l'organisme par des germes pathogènes) est un syndrome regroupant plusieurs symptômes, caractérisé notamment par une perte de poids corporel dramatique. Celle-ci résulte principalement d'une perte de masse adipeuse et de masse musculaire, appelée cachexie. La cachexie liée au cancer et au sepsis réduit la qualité et la durée de vie des patients et peut diminuer l'efficacité des traitements. De plus, la fatigue induite par les traitements de chimiothérapie et l'incapacité à réaliser des contractions musculaires volontaires qui résulte de la sédation et/ou de la ventilation mécanique imposée au patient en soins intensifs exacerbent les dysfonctions musculaires. Ainsi, la possibilité d'augmenter l'activité musculaire par l'intermédiaire de stimulations électriques (ou électrostimulation neuromusculaire) appliquées à la surface de la peau pourrait être une stratégie efficace pour lutter contre ces atteintes musculaires.

La mise en évidence d'un bénéfice de l'électrostimulation musculaire (ESNM) sur ces pathologies graves nécessite le recours aux animaux (souris). L'objectif de ce projet de recherche fondamentale est : 1) d'évaluer si un entraînement par ESNM permet de limiter les effets délétères du syndrome cachectique associé au cancer et au sepsis sur le fonctionnement du muscle squelettique, et 2) le cas échéant d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires qui expliquent ce bénéfice. Le développement de nouvelles méthodes de reconditionnement physique est primordial afin d'augmenter l'activité musculaire chez ces patients sévèrement atrophiés et déconditionnés à l'effort. Si la compréhension des mécanismes sous-jacents sera en partie analysée via l'utilisation

de cultures cellulaires, l'étude du bénéfice de l'ESNM ne peut être réalisée qu'*in vivo*, en conditions physiopathologiques *in vivo*, et ce à l'aide des modèles adéquats.

Ce projet est divisé en 4 procédures et mobilisera 1136 souris.

Les démarches mises en œuvre pour suivre les 3R sont :

- Réduction du nombre d'animaux : le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum après analyses statistiques des expériences passées de l'équipe et des données de la littérature. Les tissus musculaires des animaux sont prélevés et conservés dans une banque biologique constituée dans le laboratoire, permettant de réutiliser les tissus pour des analyses ultérieures sans recours à des animaux supplémentaires. Les accouplements sont optimisés afin de produire le nombre nécessaire de souris. Le dispositif expérimental d'électrostimulation est non invasif et permet ainsi un suivi longitudinal des animaux, permettant de réduire de manière drastique le nombre d'animaux utilisés.

- Réduction de la douleur, souffrance, raffinement : les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles sont privilégiés. Des anesthésiques et des analgésiques sont utilisés pendant et au décours des expérimentations afin de réduire au maximum le stress et la souffrance des animaux. Des mesures sont prises pour améliorer les conditions d'élevage afin d'enrichir l'environnement des souris. Aussi, le suivi de critères précis permet d'euthanasier rapidement les animaux présentant un phénotype dommageable. Ainsi, une grille de score permet d'éviter toute souffrance inutile et de prendre les mesures adéquates selon l'évolution du tableau clinique de chaque animal.

10664 Les souris Cax (Compact axial skeleton) ou Pofut1cax/cax présentent une mutation spontanée (au niveau du gène Pofut1), dont les conséquences se traduisent par la présence de déformations squelettiques plus ou moins sévères ainsi que par un développement musculaire postnatal accru. Dans ces muscles légèrement hypertrophiés, nous avons montré que le nombre de cellules satellites était diminué de manière significative. Or, les cellules satellites sont des cellules souches musculaires adultes, dont le rôle essentiel est de permettre aux muscles de se régénérer suite à une blessure ou à certaines pathologies du muscle comme l'exemple bien connu des myopathies. Par conséquent, nous émettons l'hypothèse que le processus de régénération musculaire pourrait être significativement affecté chez ces souris mutantes.

Nous envisageons donc d'étudier la régénération musculaire de ces souris suite à une blessure, induite par une injection très localisée de toxines dans le muscle tibial et sous traitement anesthésique et analgésique. La lésion sera ainsi restreinte à une petite portion d'un seul et même muscle, ce qui limite fortement la gêne et la douleur occasionnées chez l'animal. Cette étude nous permettrait ainsi de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels les cellules satellites peuvent réparer un muscle lésé, dans le contexte où cette réserve en cellules souches à forte capacité régénératrice est fortement diminuée. Nous espérons ainsi mettre en évidence des molécules d'intérêt impliquées dans ce mécanisme, ouvrant des perspectives vers d'éventuelles applications thérapeutiques.

Dans un souci de conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (règle des 3R), nous utiliserons un même individu pour plusieurs expérimentations (prélèvements post-euthanasie), avec néanmoins 20 souris par lignée (2 lignées seront utilisées : la lignée sauvage C3H et la lignée mutante Pofut1cax/cax). Il n'y a actuellement pas d'alternative à l'utilisation des animaux d'expérimentation pour étudier la régénération musculaire après induction d'une lésion de manière chimique ou mécanique.

Le stress, la douleur et les différentes contraintes imposées aux animaux lors des expérimentations seront réduits au maximum, par administration d'anesthésiques et d'analgésiques. Une surveillance quotidienne sera effectuée au cours de l'expérimentation et les animaux montrant des signes de douleur trop intenses ou trop durables (évalués par l'observation des animaux, la reconnaissance de signes spécifiques et des points limite) seront euthanasiés.

10665 L'exposition aux rayonnements ionisants à la suite d'un accident d'irradiation (accident dans une centrale nucléaire, manipulation d'une source radioactive...) ou d'un acte de malveillance peut engendrer des conséquences graves sur la santé des personnes impactées. En effet, l'irradiation d'une large surface du corps, à des doses d'irradiation moyennes à fortes, induit des lésions irréversibles regroupées sous le nom de syndrome aigu d'irradiation (SAI). Ce syndrome inclut des atteintes du compartiment sanguin, du système digestif, du système neuro-vasculaire et de la peau. A l'heure actuelle, les traitements ciblent préférentiellement le compartiment sanguin, et la prise en charge du syndrome gastrointestinal (SGI) ne reste que symptomatique, alors que les diarrhées associées à ce syndrome peuvent engager le pronostic vital.

Le tissu adipeux est une source riche en progéniteurs cellulaires et facile d'accès extrêmement rapidement. Il a été démontré que l'injection de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) issues du tissu adipeux présente un intérêt thérapeutique pour traiter le SGI mais ce traitement nécessite l'injection d'une grande quantité de CSMs disponibles après 7 jours de culture. Une sous population de ces CSMs pluripotentes, capables d'auto-renouvellement, appelées cellules Muse (Multilineage differentiating stress enduring cells) possèdent la capacité de migrer et de s'intégrer dans les tissus endommagés ou présentant une réaction inflammatoire. Cette population de cellules souches, issues du tissu adipeux, possède des propriétés innovantes et très attractives pour limiter les lésions intestinales radio-induites. Notamment, ces cellules ont un fort potentiel de régénération et des propriétés anti-inflammatoire et immuno-modulatrice. L'objectif de ce projet vise particulièrement à apporter des preuves de concept précliniques sur l'utilisation des cellules Muse en tant que traitement du SGI.

Pour comprendre de manière intégrée et fiable ces mécanismes, nous devons utiliser des modèles expérimentaux précliniques *in vivo*, comme la souris, afin de démontrer des phénomènes à l'échelle d'un organisme entier.

Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 324 souris. Le nombre de souris choisi pour ce protocole est nécessaire et suffisant pour exploiter d'un point de vue statistique les résultats obtenus.

Dans le contexte du bien-être animal, le raffinement est assuré par le fait que ces animaux seront anesthésiés, prélevés et euthanasiés selon les recommandations et en prenant en compte le bien-être animal. Des points limites seront définis et appliqués tout au long des procédures expérimentales constituant ce projet.

10666 La reconstruction mandibulaire segmentaire reste un challenge, en particulier en cancérologie où un traitement adjuvant par radiothérapie est le plus souvent réalisé assez rapidement après la chirurgie d'exérèse de la tumeur. L'objectif de cette étude est de mettre au point une technique innovante de reconstruction mandibulaire segmentaire compatible avec la radiothérapie. En effet, les techniques conventionnelles de reconstruction mandibulaire segmentaire en cancérologie ne sont pas toujours réalisables pour des raisons médicales (lambeaux osseux libres complexes) ou ne permettent pas d'avoir une continuité osseuse (plaque d'ostéosynthèse). Il convient donc de développer une solution alternative.

La technique des membranes induites a été initialement développée pour la reconstruction osseuse segmentaire des os longs en cas d'échec des techniques plus conventionnelles : i) dans un premier temps, un conformateur en ciment chirurgical est placé dans la perte de substance osseuse stabilisée par un procédé d'ostéosynthèse et les plans de couverture sont suturés ; ii) après un minimum de 4 semaines, une membrane vascularisée appelée membrane induite s'est spontanément développée autour du ciment qui est alors retiré et la cavité ainsi délimitée par la membrane est comblée par de l'os autologue.

Cette technique pourrait être avantageusement utilisée en contexte carcinologique avec la réalisation du traitement adjuvant par radiothérapie entre les 2 temps chirurgicaux. La mise en place du ciment chirurgical permettrait de conserver un espace de taille équivalente à la perte de substance osseuse, espace qui serait comblé après la fin de la radiothérapie pour obtenir une régénération osseuse avec rétablissement de la continuité.

Le comblement de la membrane induite par de l'os autologue présente des limites liées à la morbidité du site donneur (en général au niveau du bassin) et à la quantité limitée d'os disponible qui pourrait compromettre la régénération de grandes pertes de substances mandibulaires. L'utilisation de substitut osseux phosphocalciques en alternative à l'os autologue a déjà été utilisée en régénération mandibulaire mais jamais au sein d'une membrane induite et jamais après irradiation.

Les objectifs de cette étude seront i) d'évaluer la régénération osseuse mandibulaire segmentaire au sein d'une membrane induite non irradiée avec greffe d'un substitut osseux phosphocalcique (groupe A), ii) d'évaluer la régénération osseuse mandibulaire segmentaire au sein d'une membrane induite irradiée avec greffe d'un substitut osseux phosphocalcique (groupe B).

Pour permettre d'avoir suffisamment d'animaux pour une comparaison statistique des échantillons des deux différentes conditions, 8 porcs seront opérés par condition soit 16 porcs au total. Les animaux seront opérés 3 fois : une première fois pour l'avulsion des dents mandibulaires droites, une seconde fois 8 semaines après pour la réalisation de la mandibulectomie avec mise en place du ciment, une troisième fois pour la greffe du biomatériau après un délai minimum de 8 semaines. Les animaux du groupe B seront irradiés au niveau de la mandibule droite entre la seconde et la troisième chirurgie à une dose clinique en multi fractionné. Les animaux seront euthanasiés 6 mois après la greffe du biomatériau pour une analyse de la régénération osseuse mandibulaire par radiographie aux rayons X (scanner en coupes fines) et analyse histologique.

Remplacer : Des expérimentations précliniques chez le gros animal sont nécessaires pour valider le concept dans des conditions les plus proches possibles de la clinique avant une expérimentation clinique, l'utilisation de petits animaux n'est pas ici adaptée. Raffinement : Les animaux auront une période d'acclimatation de 10 jours avant la première procédure. Conditions d'hébergement décrites dans la dernière directive européenne (cycle jour/nuit de 12h/12h et température de 16°C +/- 5°C), Prise en compte de la douleur par l'utilisation d'analgésiques à doses appropriées, suivi post-opératoire avec des points limites suffisamment prédictifs, alimentation adaptée, suivi quotidien des animaux. Réduire : Pour n'utiliser que le nombre d'animaux nécessaire tout en garantissant la validité scientifique et statistique des résultats, nous considérons qu'un nombre minimum de 16 animaux est nécessaire.

10667 La demande pour des analgésiques/antalgiques d'efficacité supérieure à celle des opiacés mais dénués d'effets secondaires n'est pas satisfaite. L'industrie pharmaceutique continue donc à investir activement dans la recherche de nouvelles classes d'analgésiques/antalgiques. Dans ces recherches, les molécules candidates aux essais cliniques sont sélectionnées quasi exclusivement sur la base de résultats comportementaux. Les échecs récurrents de l'industrie pharmaceutique dans la tentative de mise sur le marché de nouveaux antalgiques mettent en évidence la nécessité d'élaborer des stratégies de développements complémentaires (pour ne pas dire alternatives), à celles basées sur une évaluation exclusivement comportementale de l'efficacité des candidats médicaments.

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

L'utilisation d'animaux pour les tests d'efficacité d'analgésiques/antalgiques est rendue nécessaire par le fait que, dans de nombreux cas, le mécanisme d'action de ces médicaments est un processus complexe impliquant la totalité du système nerveux (de manière imagée, des communications entre le cerveau, la moelle épinière, et les tissus périphériques). Pour satisfaire les 3 R, la mesure de l'activité des neurones spinaux se fait chez l'animal anesthésié et permet donc de pouvoir tester

l'efficacité de candidat médicament sur la réponse à des stimuli très nociceptifs sans aucune souffrance pour l'animal, ce qui n'est pas envisageable chez un animal vigile. Ces tests apportent donc des informations indispensables au développement de nouveaux médicaments, informations qui ne peuvent être obtenue par d'autres moyens, tout en garantissant une absence de souffrance chez l'animal qui est anesthésié. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, plusieurs doses de candidat médicaments peuvent être testées chez un même animal. Le nombre d'animaux utilisés est aussi réduit par le fait que chaque animal est son propre contrôle (principe des mesures répétées). Utilisé de manière précoce dans le développement de candidats médicaments et la détermination de leur cible, ces expériences permettent de réduire l'utilisation d'animaux dans des tests comportementaux qui ont tendance à générer des faux positifs.

Il est essentiel que ces expériences soient réalisées au sein d'un laboratoire très spécialisé pour garantir que chaque animal utilisé génère des données de qualités. Le but de ce projet est d'établir et d'utiliser des protocoles robustes d'enregistrement de ces neurones spinaux pour permettre le criblage de candidats médicament chez le rat et la souris anesthésiés dans le cadre d'une société de service pour l'industrie pharmaceutique. Il existe de nombreuses sociétés de service qui utilisent des animaux pour des tests comportementaux, mais il n'existe pas encore de société spécialisée dans le domaine de l'électrophysiologie *in vivo* pour la douleur dans le monde. Ce projet concerne l'utilisation de 1100 rongeurs (rats ou souris) sur 5 ans.

10668 Le projet s'inscrit dans une thématique générale d'évaluation de l'effet thérapeutique anti-inflammatoire et de modulation de l'homéostasie de la muqueuse intestinale et des réponses immunes locales et systémiques dans différents contextes physiopathologiques chez la souris ou le rat. Ces études permettront d'évaluer l'efficacité de traitements préventifs ou thérapeutiques sur l'inflammation ainsi que la compréhension des mécanismes associés aux modifications transitoires ou durables de l'immunité et du microbiote intestinal de l'individu dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

En effet, la prévalence des MICI telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse s'accroît depuis ces dernières années, en particulier chez les personnes de 20 à 30 ans et chez les adolescents. Cette maladie évolue par poussée entrecoupée de phase de rémission. Cette maladie est très invalidante du fait de ses symptômes (diarrhée, vomissements, fatigue...). En Europe, 2.2 millions de personnes sont affectées par les MICI. Malgré une évolution clinique bien connue et une recherche intensive, les causes sont encore mal connues. Il a été clairement établi que les MICI sont des maladies multifactorielles impliquant des facteurs génétiques, bactériens et environnementaux. Les patients atteints de MICI sont caractérisés également par une dysbiose. L'utilisation des traitements actuels ne permettent pas de guérir de ces pathologies et certains patients deviennent résistants aux traitements actuellement sur le marché. Ces pathologies nécessitent de développer de nouveaux « médicaments » et d'évaluer leur efficacité et leur innocuité *in vivo* dans des modèles de colite chimiquement induite par le TNBS (acide trinitrobenzenesulfonique) ou le DSS (Dextran sulfate sodium) ou induite par des agents infectieux (*Citrobacter*, *Escherichia coli*) ou par des cellules impliquées dans la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire (Modèle de colite induite par le transfert de cellules T CD45 RBhigh chez la souris SCID). L'impact de conditions nutritionnelles consistant en l'apport de microorganismes de qualité alimentaire (vivants, inactivés ou sous forme de fractions), de matrices alimentaires, de fibres polysaccharidiques (prébiotiques), vitamines ou minéraux, seuls ou en combinaison, tous considérés comme sans danger sont également des pistes largement étudiées pour moduler l'inflammation.

Ces évaluations précliniques n'interviennent qu'après avoir spécifiquement évalué et sélectionné *in vitro* de nouveaux « médicaments candidats », tester leurs propriétés anti-inflammatoires, leurs effets sur la flore endogène, leur effet potentiellement chélateur de métaux lourds, afin de limiter au mieux le nombre d'animaux (Réduire). Il n'est pas possible de reproduire *in vitro* la physiologie intégrée et complexe du dialogue entre le système immunitaire, la muqueuse intestinale et le microbiote digestif de mammifère (Remplacer) et ceci nécessite donc le recours à des modèles *in vivo* de colites induites par des agents chimiques ou infectieux largement décrits et reconnus par la

communauté scientifique. Les procédures sont définies au mieux pour offrir le maximum de confiance dans les résultats générés dans le respect du bien-être des animaux en limitant la souffrance animale. Les animaux en phase expérimentale sont observés et pesés quotidiennement pour une attention particulière de ces points limites. (Raffiner).

Le nombre total d'animaux envisagé sur les 5 ans à venir est estimé au maximum 12300, répartis comme suit en 5 procédures qui doivent être considérées comme indépendantes les unes des autres.

10669 Il n'existe pas actuellement de traitement curatif de la maladie d'Alzheimer, maladie dont la prévalence est amenée à augmenter régulièrement au cours des prochaines décennies du fait du vieillissement de la population. L'amélioration de la connaissance de la maladie permettra d'identifier de nouvelles possibilités de traitements et de nouveaux marqueurs diagnostiques afin d'améliorer la prise en charge des patients, ce qui est un enjeu crucial de santé publique.

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

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

Différents modèles rongeurs seront utilisés afin de :

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

2) caractériser l'évolution de la tauopathie induite par injection de vecteurs de transfert de gènes codant différentes formes (normale ou mutée) de Tau, sur l'animal adulte dans le cerveau et les voies visuelles, et sur l'animal nouveau-né,

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

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données suffisantes afin de comparer les différentes conditions expérimentales par des tests statistiques préalablement sélectionnés en fonction des questions étudiées. Le projet prévoit d'utiliser un maximum de 1566 rongeurs. Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale du cerveau, en particulier les interactions structurales et fonctionnelles des différents types cellulaires que nous étudierons au cours de ce projet.

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

10670 Les différentes sociétés utilisatrices d'anticorps monoclonaux, possèdent différents clones, dont les anticorps produits sont utilisés dans des kits diagnostics en santé humaine (allergie, hémostase...) largement distribués sur le marché mondial, et parmi les plus référencés depuis de nombreuses années. Ces trousse de diagnostics sont des kits I.V.D (*In vitro* Diagnostic) enregistrés officiellement et marqués CE sous la réglementation « ISO 9001-2008 » et « 13485 ». Certains sont également FDA Approved.

Ces clones doivent aujourd'hui être produits par la technique des ascites, à raison d'une à cinq productions par clones et par an, correspondant à 45 000 animaux (souris) sur 5 ans. Ces clones ont été développés et sélectionnés pour leur spécificité et leur rendement il y a plus de 25 ans.

Suite à la demande des autorités de favoriser d'autres techniques de production, des démarches ont été entamées depuis 2007, pour le transfert des productions d'anticorps en culture « *in vitro* » et limiter ainsi le recours à l'utilisation de murins. Malheureusement, la production en bioréacteur pour les différents clones, dont cette DAP fait objet, a modifié certaines caractéristiques de l'anticorps et ne permet pas, à ce jour, de valider l'équivalence entre l'anticorps monoclonal "*in vitro*" et l'anticorps monoclonal "*in vivo*". Cette perte de qualité n'est pas acceptable ni autorisée par les autorités compétentes en raison du marquage CE et de la finalité diagnostic de nos produits.

Des investigations et des essais sont toujours en cours pour parvenir à utiliser certains anticorps monoclonaux "*in vitro*".

Dans le but de limiter au maximum la douleur, un analgésique est administré par voie sous-cutanée avant injection de l'adjuvant. A tout moment l'opérateur peut décider de l'arrêt du protocole s'il juge que l'animal est en trop grande détresse. A noter également, qu'un prélèvement unique est réalisé sur animal préalablement euthanasié.

Par ailleurs, les souris utilisées ne sont pas élevées à cette fin, mais sont des femelles anciennes reproductrices destinées à la réforme.

10671 Les médicaments vétérinaires donnés aux animaux pour garantir leur bonne santé, contribue à la pollution des écosystèmes et à l'émergence de résistances aux traitements médicamenteux, en particulier les antiparasitaires. Des méthodes alternatives doivent donc être recherchées. Chez les herbivores, les nématodes (vers ronds) gastro-intestinaux sont ingérés en même temps que l'herbe au pâturage et provoquent un affaiblissement général de l'animal plus susceptible aux maladies et moins productifs, de même qu'un cout supplémentaire pour l'éleveur (achat de vermifuge). Une solution pour lutter contre ce parasitisme, tout en réduisant l'utilisation de médicaments, est de sélectionner les animaux pour la résistance aux parasites. Mais cette sélection pourrait se faire au détriment de caractères dits fonctionnels, comme la reproduction ou la production, particulièrement dans des conditions de sous nutrition qui peuvent être observées lorsque le pâturage est de mauvaise qualité.

L'objectif de cette étude est de comprendre si en sélectionnant des ovins sur la résistance au parasitisme nous ne provoquons pas une modification d'autres fonctions biologiques, d'intérêts en élevage, comme la lactation, la gestation ou la croissance.

Les infestations expérimentales des jeunes agnelles servent à mimer l'immunisation naturelle des animaux au pâturage (1ère partie du projet). Dans la deuxième partie du projet, l'infestation répétée de brebis peripartum (autour de la mise-bas) permettra d'évaluer la compétition entre les fonctions de résistance, croissance, gestation et allaitement.

Pour cela nous allons utiliser 97 brebis de race Romane pour la première partie du projet, puis parmi elles 48 pour la deuxième partie du projet, et les suivre de leur sevrage à leur première lactation.

Des mesures seront réalisées régulièrement pour étudier leur réponse immunitaire, leur digestion et le devenir des nutriments absorbés, notamment lors d'administration expérimentale de vers nématodes par voie orale. Un vermifuge sera administré dès que les renseignements nécessaires auront été recueillis.

Les effets chez le jeune d'une restriction protéique isolément d'une sous-alimentation globale, et/ou d'une infestation parasitaire majeur chez la mère sont très peu documentés, et à notre connaissance aucune donnée n'existe chez le ruminant. C'est pourquoi tous les jeunes issus des brebis précédemment citées et allaités par leur mère seront inclus dans ce projet afin de suivre leur état de santé et les conséquences pour eux de l'expérimentation menée sur leur mère. Le nombre total d'animaux utilisé dans ce projet sera donc de 193.

3 R :

- Remplacer :

On ne peut pas remplacer l'hôte (pour cette étude : la brebis) pour la réalisation du cycle parasitaire et l'étude de l'impact de la sélection à la résistance aux parasites sur les autres fonctions biologiques de l'hôte. Par ailleurs la sélection génétique n'est réalisable que sur des animaux.

- Réduire :

Le nombre d'animaux prévus dans l'expérimentation a été limité au maximum pour avoir un effectif garantissant l'interprétation des données.

- Raffiner :

Les brebis et leurs agneaux sont hébergés sur une litière paillée et en lots de manière à pouvoir exprimer leurs comportements sociaux. Elles sont habituées à être manipulées et les prélèvements sont réalisés par du personnel expérimenté. Le milieu est enrichi de disque à mordiller suspendus. Les animaux seront observés quotidiennement afin d'évaluer toute altération de l'état général (anorexie, prostration).

10672 Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires. Les traitements conventionnels de nombreux cancers tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ont démontré des limites d'efficacité nécessitant un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques.

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

La perspective de ce projet est d'évaluer et de comparer, dans différents modèles murins syngéniques et de xénogreffes humaines de cancers, différents virus oncolytiques exprimant des gènes thérapeutiques (virus « armés »). Les cancers ciblés correspondent aux tumeurs pour lesquelles il y a un fort besoin médical en clinique humaine.

De plus, sachant que le développement clinique de ces virus prévoit de les combiner avec de la chimiothérapie standard ou de l'immunothérapie afin de potentialiser l'activité anti-tumorale, le projet se propose d'explorer dans les modèles murins les combinaisons de ces virus avec des agents de chimiothérapies standards ou d'immunothérapie utilisés en clinique humaine pour le traitement de cancers de différentes origines.

Le but de ce projet sera d'évaluer l'activité thérapeutique anti-tumorale des virus oncolytiques « armés » en association ou non avec des substances à activité anti-tumorale. Cette activité thérapeutique sera analysée dans une large variété de modèles murins et humains de cancers.

Les résultats issus de ce projet permettront une meilleure compréhension des mécanismes d'activité des virus oncolytiques en association avec des substances anti-tumorales couramment utilisées en chimiothérapie anticancéreuse.

Les résultats permettront également de valider chez l'animal l'activité thérapeutique anti-tumorale de nouvelles générations de virus oncolytiques dans différents types de cancer.

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

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

Nous prévoyons de mesurer l'effet bénéfique que pourrait apporter une « poly-thérapie » en combinant les substances anti-tumorales capable de potentialiser les effets oncolytiques de nos virus candidats dans nos modèles cellulaires.

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

Un nombre maximal de 8640 souris (immuno déficientes et immuno compétentes) est envisagé pour ce projet.

- Raffiner : Tout au long de leur vie, une attention particulière est portée au bien-être des animaux en particulier par un enrichissement de leur milieu de vie qui leur permet d'assouvir les comportements liés à leur espèce. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux pendant toute la durée des expérimentations, dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères, avec eau et nourriture *ad libitum*.

La réalisation par des techniciens rompus à ses manipulations garantissent la bonne reproductibilité des expériences et un suivi optimal du bien-être des animaux.

Du fait de la combinaison avec nos virus, des doses sub optimales de chimiothérapies et anticorps sont utilisées. Les effets dus au traitement seront surveillés et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux (grille de score évaluant le volume tumoral, l'apparence de la tumeur, l'évolution pondérale, l'apparence physique général, le comportement) sont mis en place afin de limiter le stress et la souffrance des animaux.

10673 Depuis ces dernières décennies, on assiste à une augmentation des cas d'asthme allergique dans les pays industrialisés. Environ 300 millions d'individus seraient affectés. C'est une maladie inflammatoire chronique particulièrement invalidante conduisant à l'essoufflement du patient. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement curatif. Les traitements prescrits agissent sur la survenue des symptômes ou servent à limiter l'inflammation pour permettre un meilleur contrôle de la maladie. Les anti-inflammatoires disponibles actuellement ont des activités limitées et présentent de nombreux effets indésirables. Il apparaît donc nécessaire de mettre au point des traitements anti-inflammatoires efficaces et présentant moins d'effets secondaires.

Notre objectif est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire et antiasthmatique de produits pharmacologiques en cours de développement, candidats-médicaments, dans des modèles d'inflammation des voies aériennes représentatifs de la maladie asthmatique chez la souris (modèles d'asthme).

Le développement de candidats-médicaments à partir de modèles moléculaires et cellulaires disponibles requiert une transposition dans des modèles intégrés et complexes. C'est pour cette raison qu'une approche *in vivo* chez la souris est nécessaire pour s'assurer de l'activité anti-inflammatoire des nouveaux candidats-médicaments.

La réalisation de cette procédure par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Nous avons montré que la parfaite maîtrise des procédures expérimentales permet une mesure efficace de l'activité anti-asthmatique de 10 candidats-médicaments par an sur une période de 5 ans dans les modèles d'asthme chez la souris, soit un total de 3120 souris.

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance de l'animal. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupe de 8, dans des cages de grande taille et enrichies de tubes en carton.

La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments pour pallier la survenue de tout signe de toxicité. Il sera procédé à l'euthanasie des animaux si les signes d'une douleur trop élevée sont observés.

10674 L'obésité est un problème de santé publique mondiale. Il a été montré que le nombre d'accident vasculaire cérébral (AVC) est plus élevé chez les personnes obèses que dans le reste de la population, indiquant l'installation d'une fragilité des vaisseaux sanguins cérébraux dans cette pathologie. Cette fragilité induit une dérégulation fonctionnelle du débit sanguin cérébral (DSC) qui peut se produire avant l'avènement de l'AVC. Donc, l'enregistrement du DSC *in vivo* est intéressant pour dépister un problème sous-jacent des vaisseaux sanguins.

Pour connaître l'état fonctionnel des vaisseaux sanguins dans l'obésité, nous voulons utiliser une méthode d'imagerie cérébrale par ultrasons dans un modèle d'obésité chez la souris, modèle obtenu par une alimentation enrichie en lipides. Connaissant la forte sensibilité olfactive et tactile des rongeurs, nous enregistrerons les variations de DSC en réponse à la présentation d'odeurs

dans le bulbe olfactif et à la stimulation des vibrisses dans le cortex somatosensoriel chez la souris anesthésiée.

Le principe de la technique d'imagerie par ultrasons est basé sur l'envoi d'ondes ultrasonores dans les tissus cérébraux. Ces ondes se propagent comme les ondes à la surface de l'eau. Les échos renvoyés par les structures traversées par ces ondes permettent, après traitement des données, d'obtenir des images précises des vaisseaux sanguins cérébraux. Le contraste obtenu sur ces images est lié aux variations du volume sanguin, variations qui sont activement contrôlées par les cellules du cerveau. Les ondes ultrasonores pénètrent profondément dans le cerveau, ce qui nous permettra d'enregistrer l'ensemble de l'arbre vasculaire de la surface jusqu'à plusieurs millimètres de profondeur.

Nous effectuerons la comparaison entre des groupes de souris obèses et de souris témoins non obèses ayant été alimenté pendant 3 mois de régime hyperlipidique et qui présentent à cet âge des caractéristiques métaboliques de l'obésité, notamment un fort surpoids. Le nombre de souris utilisées sera de 144 sur 4 ans. Le remplacement des souris n'est pas possible dans le cadre de ce projet puisqu'aucun modèle invertébré ou modèle cellulaire *in vitro* ne permet de reproduire l'activité vasculaire ou l'obésité des mammifères. Le nombre de souris utilisé sera minimisé suivant le degré de liberté des tests statistiques et de leur significativité. Au niveau du raffinement, nous utiliserons un agent anesthésique pour immobiliser la souris mais aucune chirurgie ne sera nécessaire car les ultrasons traversent la peau et l'os du crâne sans aucun problème. Enfin, au cas où des problèmes de santé chez les souris surviendraient pendant le régime hyperlipidique, nous avons défini des critères d'observation et des points limites dans les protocoles concernés.

10675 Les maladies du foie constituent un problème majeur de santé publique. Cependant, même si les hépatites virales et la maladie hépatique alcoolique sont cruciales au niveau mondial, elles ne représentent pas la majorité des affections hépatiques. En effet, les pathologies hépatiques associées à l'obésité (NAFLD) représentent la première cause de maladie du foie dans les pays occidentaux. Les NAFLD regroupent différents stades d'atteintes hépatiques allant de la stéatose bénigne (accumulation de gras dans le foie) à la stéatohépatite (NASH), la fibrose ou la cirrhose. Cette maladie hépatique a été associée à des changements de composition du microbiote intestinal (ensemble des microorganismes du tube digestif) et un rôle causal de ce microbiote dans le développement de ces atteintes hépatiques a été démontré chez la souris. Certaines espèces bactériennes ont été identifiées comme étant plus fréquemment associées à la stéatose bénigne et sont significativement moins abondantes dans les formes plus évoluées de la maladie (NASH). Ces espèces peuvent être identifiées par des techniques de séquençage haut débit grâce à leurs gènes et sont alors appelées MGS (MetaGenomic Species).

Le but de notre étude est d'identifier ces MGS dans des microbiotes de patients atteints de stéatose bénigne et de confirmer leur effet protecteur vis-à-vis de l'évolution vers les stades avancés de la maladie. L'une d'entre-elle semble montrer des effets bénéfiques anti-inflammatoires *in vitro*. Pour cela, des souris qui ont subi un traitement antibiotique et dont le microbiote intestinal a été appauvri suite à ce traitement seront colonisées avec des microbiotes de patients identifiés comme étant enrichis ou au contraire appauvris en MGS d'intérêt, puis ces souris seront soumises à un régime riche en graisses et en fructose, pour certaines d'entre-elles complémenté par un gavage avec la MGS d'intérêt afin d'explorer l'effet des microbiotes installés sur l'apparition et l'évolution des atteintes hépatiques.

Remplacement : Malgré la complexité des interactions entre les différents paramètres, des résultats préliminaires encourageants ont été obtenus *in vitro* dans un premier temps sur un modèle inflammatoire d'hépatocytes humains, et confortés par des corrélations bioinformatiques. Cependant, le modèle de l'animal vivant reste irremplaçable pour la vérification de ces résultats avant le passage aux études cliniques.

Réduction : L'utilisation du modèle souris permet d'étudier les relations microbiote-hôte et les évolutions du microbiote intestinal *in vivo* en lien avec les nombreuses données et méthodologies existantes sur ce modèle. Lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

Le projet prévoit ainsi le recours à un minimum nécessaire de 144 souris sur 5 ans (6 groupes contrôles, 6 groupes tests). Chaque groupe sera composé de 12 souris ce qui est un minimum pour obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.

Raffinement : Le suivi quotidien du poids des souris et de leur comportement constitue les points limites de l'expérimentation (prise ou perte de poids excessives par rapport au poids de départ). Les souris seront traitées pendant 2 semaines aux antibiotiques puis auront une alimentation spéciale riche en gras et une boisson riche en sucre. Elles seront pesées, des fèces et du sang seront collectés de façon hebdomadaire pour un suivi de tolérance au glucose et de taux d'insuline, ce qui permettra de limiter la durée du traitement (10 semaines maximum), voire d'éviter les effets délétères à long terme de la NAFLD. Pour récolter les fèces, les souris sont isolées et placées dans un pot ouvert durant quelques minutes, car la défécation naturelle chez la souris due à ce léger stress est quasi immédiate.

Pour le prélèvement sanguin, une légère incision au scalpel au niveau de la veine latérale de la queue sera réalisée afin de récupérer quelques gouttes de sang. Enfin post-mortem, le foie, les différents tissus adipeux et l'ensemble du tube digestif seront prélevés pour réaliser des analyses histologiques et biomoléculaires. Toutes les souris auront dans chaque cage un enrichissement de milieu par l'ajout de Sopalin (pour faire le nid) et d'un bâton de bois à ronger. Les souris seront 4 par cage pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

10676 Le syndrome de l'X fragile (FXS) est une pathologie fréquente de déficience mentale (DM) syndromique associée à des signes physiques caractéristiques de dysmorphie faciale, des déficits comportementaux de types autistiques (i.e défauts de la communication et de l'interaction sociale) et à des perturbations sensorielles. Avec une prévalence de 1/4000 hommes atteints et 1/7000 femmes, cette pathologie du neurodéveloppement se révèle être un problème de santé publique majeur. Le FXS est caractérisé par des réseaux neuronaux déséquilibrés rendant le fonctionnement cérébral instable et/ou inadapté aux stimuli sensoriels. Très tôt, les patients présentent une forte aversion pour le contact social visuel, une forte sensibilité auditive ou des réponses non adaptées aux stimuli tactiles. Ainsi, les défauts comportementaux d'interaction sociale et plus généralement les attitudes défensives généralisées des patients seraient étroitement liées aux déficits d'ajustements de la compréhension sensorielle.

Le but de notre projet est de mieux comprendre l'origine de ces anomalies sensorielles en explorant les aspects électrophysiologiques de ces sens. Nous testerons aussi l'impact d'une molécule d'intérêt sur la perturbation de ces sens (BMS-204352, i.p, 2 mg/kg, injection unique). Pour ce faire nous utiliserons la souris Fmr1 ko, modèle validé de la pathologie FXS. Dans ce cadre nous étudierons la vision, l'audition et la perception de la douleur grâce à des techniques électrophysiologiques et comportementales peu ou pas invasives. Quarante animaux seront utilisés au total.

Toutes les dispositions seront prises pour respecter la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé avec l'aide d'un logiciel permettant d'évaluer le nombre d'animaux minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les paramètres à mesurer (données préliminaires obtenues dans d'autres expériences réalisées au laboratoire)

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière), et les animaux seront surveillés quotidiennement. En cas d'état de détresse, ou en cas de perte de poids >20% du poids corporel, la décision de l'euthanasie sera prise en concertation avec au moins un responsable du bien-être des animaux du projet. Par ailleurs, les techniques utilisées seront réalisées sous anesthésie générale avec mélange kétamine (100 mg/kg) + xylazine (10mg/kg) (IP, 10µl/g de souris).

- Remplacement : La compréhension des mécanismes du syndrome du Fragile X ne peut se réaliser que sur animaux vivants pour se placer dans un contexte physiologique intégré. Il n'est donc pas possible de prévoir une méthode substitutive pour répondre à la question scientifique de ce projet.

10677 L'hématopoïèse désigne le processus physiologique de production des cellules sanguines à partir de cellules souches hématopoïétiques dont les mécanismes restent encore mal caractérisés tout spécialement dans l'espèce humaine. Dernièrement il a été démontré l'existence de deux voies de production indépendante du compartiment cellulaire à l'origine des lymphocytes (cellules jouant un rôle dans la réponse immunitaire).

Notre projet de recherche fondamentale, concernant les premières étapes de l'hématopoïèse normale et pathologique (ex : cas des leucémies, cancer du sang) et a comme objectifs : (i) de mieux caractériser les mécanismes qui contrôlent l'émergence de ces deux voies de différenciation ; (ii) de tester l'effet de gènes candidats (c'est-à-dire des gènes impliqués spécifiquement dans la régulation de la différenciation) sur le développement des lymphocytes ; (iii) de mettre au point des modèles de développement de leucémie expérimentale humaine chez la souris. Ce projet va permettre une meilleure compréhension du développement normal et pathologique du système immunitaire.

Vu la difficulté de l'obtention de prélèvements humains exploitables, il est essentiel d'avoir recours à un modèle animal. Le modèle choisi permet de mimer fidèlement le développement hématopoïétique humain. Il consiste à injecter des cellules souches hématopoïétiques humaines (par injection par voie intraveineuse) à des souris dépourvues de système immunitaire, évitant ainsi le rejet de greffe. Les cellules souches hématopoïétiques humaines vont s'établir la moelle osseuse des souris, s'y multiplier et se différencier afin de générer toutes les populations de lymphocytes humains. Dans le cadre de la mise en place d'un modèle murin de leucémie expérimentale humaine, les cellules souches hématopoïétiques humaines auront été préalablement modifiées pour exprimer des gènes leur conférant un caractère tumoral.

En accord avec la règle des 3R, nous avons réalisé le maximum d'expériences *in vitro* (modèle de différenciation en présence de facteurs de croissance et de cellules support). Néanmoins, le développement du système hématopoïétique est un processus dynamique complexe qui ne peut pas être reproduit parfaitement *in vitro*. Il est donc indispensable de générer les différentes populations d'intérêt dans un organisme entier. Compte tenu de l'impossibilité de remplacer complètement les expériences *in vivo*, nous avons réduit le nombre de souris utilisés au minimum nécessaire et suffisant pour satisfaire la validité scientifique de l'étude, en particulier au niveau de l'analyse statistique. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 500 souris sur 5 ans. Afin de veiller au bien-être des souris au cours de l'expérimentation, une surveillance quotidienne sera effectuée (apparence, comportement). Dans le cas du modèle de leucémie expérimentale humaine, une attention particulière sera apportée aux souris en complétant la surveillance quotidienne par une pesée hebdomadaire et un suivi des cellules tumorales dans le sang. Les souris présentant une souffrance et/ou une douleur définies par des modifications des paramètres étudiés seront euthanasiées selon la méthode réglementaire. Le suivi des souris en expérimentation se fera sur une période maximale de 15 semaines, à l'issue de laquelle tous les animaux seront euthanasiés.

10678 L'épilepsie temporale est une maladie chronique et neurodégénérative dont le mécanisme reste mal compris. Pour certaines formes de cette maladie, les médicaments disponibles restent inefficaces. Une neurochirurgie apparaît comme une solution de dernier recours mais dont l'efficacité n'est valable que dans certains cas. Pour l'instant, les modèles animaux les plus utilisés sont des modèles induits pharmacologiquement (exemple : injection de pilocarpine) ou par une stimulation électrique (« kindling »). Ces modèles présentent des lésions cérébrales qui ne sont pas pertinentes par rapport à ce qui est rencontré chez les patients. Il existe donc un besoin pour le développement de modèle animal présentant des lésions similaires aux patients épileptiques comme la sclérose de l'hippocampe associée à des convulsions. Il a récemment été développé une souris déficiente en protéine Girdin. La mutation est récessive. Ainsi, à l'état hétérozygote, la souris ne présente pas de phénotype épileptique. La souris homozygote pour la mutation (Girdin KO)

présente des crises épileptiques associées à une sclérose d'hippocampe, sans lésion pour les autres régions du cerveau. La fréquence des crises épileptiques varie entre 4 et 15 par jour et apparaissent à partir de l'âge de 30 jours. Le modèle Girdin KO présente donc des caractéristiques pertinentes pour un modèle d'épilepsie temporale. Ce modèle permet d'étudier les effets à long terme de médicament sur le développement des convulsions et de la sclérose de l'hippocampe. Nous réalisons ce projet dans le cadre d'une prestation de service dont l'objectif est l'élevage et le maintien de la lignée de souris Girdin KO afin que notre client puisse recevoir le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de ses études. Pour ce projet, un nombre de 4000 souris sera utilisé. La règle de la réduction est ainsi appliquée avec la production du juste nombre d'animaux nécessaire à la réalisation des études. L'élevage de ces souris est assuré par un accouplement de mâles et femelles hétérozygotes pour la mutation. Les souris d'intérêt sont détectées par génotypage à partir d'un prélèvement issu d'une biopsie caudale (prélèvement de 1 à 3mm réalisé entre une et deux semaines d'âge) ou par un prélèvement issu d'une biopsie d'oreille si l'animal doit être prélevé après 17 jours. Cela permet de détecter les souris homozygotes pour la mutation. En effet, la déficience totale de la protéine Girdin se révèle mortelle chez les homozygotes si les animaux reçoivent une alimentation standard autour de l'âge du sevrage car ces souris apparaissent trop faibles pour s'alimenter correctement avec un aliment solide. Ainsi, les souris KO doivent recevoir un supplément alimentaire sous forme de gel nutritif autour de cet âge. Cette supplémentation sous forme de gel permet de limiter la perte de poids de ces souris qui retrouvent un poids normal vers l'âge de 2 à 3 mois et une espérance de vie semblable aux souris contrôles. La règle de raffinement est ainsi respectée. Le bien-être des animaux est également assuré par leurs conditions d'hébergement respectant leurs besoins physiologiques et la mise en place d'un enrichissement adapté. Ils font l'objet d'une surveillance quotidienne.

10679 La présente saisine explicite la procédure de prise d'images au scanner à rayons X sur animaux vivants pour l'espèce porcine.

Le scanner à rayons X est en général utilisé pour prendre des mesures de composition corporelle sur un même animal à des âges différents. Il permet de réaliser ces mesures *in vivo* et sans douleur ; auparavant, cette mesure était faite par dissection après euthanasie.

La saisine décrit la procédure complète d'anesthésie et de prise de mesure au scanner sur porc vivant. La demande est faite pour une durée de 5 ans durant lesquels 200 animaux seront analysés. Cette démarche s'inscrit dans la règle des 3 R :

- Réduction : l'utilisation du scanner permet de réduire le nombre d'animaux utilisés pour les expérimentations. Un même animal peut être analysé à différents stades de croissance ; auparavant, chaque mesure fine de composition corporelle nécessitait l'euthanasie et une dissection.

- Raffinement : c'est une méthode d'imagerie externe, non-invasive, qui évite l'euthanasie et génère peu de stress.

- Remplacement : la procédure en elle-même est une méthode de remplacement de techniques basées sur l'euthanasie d'animaux. Elle est utilisée pour des études spécifiques à l'espèce porcine et est à ce jour la meilleure technique de suivi précis de composition corporelle des animaux.

10680 L'objectif général de ce projet est la production de modèles animaux pertinents pour l'étude du rôle des protéines de la polarité cellulaire et planaire (PCP) dans le cerveau au cours du développement et à l'âge adulte. Les protéines de la PCP contrôlent et coordonnent l'orientation des cellules dans l'espace nécessaire à l'élaboration des organes. Dans le cerveau, il existe une protéine de la PCP, Vangl2, qui interagit sur la polarité neuronale et le guidage axonal des neurones. La mutation spontanée pour le gène Vangl2 que nous souhaitons étudier est létale aux stades embryonnaires. Le système Cre-lox nous permet une mutagenèse ciblée des gènes dans certains tissus sans perturber le développement du reste de l'animal. Dans ce système le génome de souris dites « Cre » a été modifié afin d'exprimer la recombinaison Cre sous le contrôle d'un promoteur spécifique. Cette enzyme est capable d'exciser des fragments d'ADN situés entre deux séquences particulières d'ADN : les sites « loxP ». En croisant les souris « Vangl2-loxP » avec les souris « Cre » on

obtiendra des souris chez lesquelles l'enzyme Cre excise le gène Vangl2 de l'ADN. Afin de contrôler la délétion du gène Vangl2 dans l'espace-temps on utilise divers promoteurs spécifiques de la Cre recombinase : le promoteur CAMKII qui permettra l'expression de la Cre recombinase spécifiquement dans les neurones et à partir de la 3ème semaine postnatale ; le promoteur EMX1 qui permettra l'expression de la Cre recombinase dans pratiquement tous les neurones du cortex cérébral à partir du jour embryonnaire 9,5 (E9,5) ; et le promoteur NEX qui permettra l'expression de la Cre recombinase dans le néocortex et l'hippocampe à partir du jour embryonnaire 11,5.

Règle des 3R. Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. **Raffiner :** Le système Cre-loxP permet de réduire les effets défavorables résultant de l'ablation d'un gène et ainsi minimiser les effets négatifs sur le bien-être animal et limiter les décès pouvant être associés aux animaux knock-out (KO). En effet, la génération d'un animal KO consiste à « supprimer » un gène dans l'ensemble de l'organisme de l'individu. L'impact de cette altération dès embryogenèse et sur la totalité des organes peut entraîner des anomalies sévères pouvant conduire à des décès prénataux ou postnataux. Avec le système Cre-lox, la délétion du gène étudié peut être dirigée à la fois dans l'espace, c'est-à-dire dans un organe ou une structure spécifique de l'organisme, et dans le temps, c'est à dire à un stade particulier du développement de l'individu. Tous les animaux sont chacun observé fréquemment par le zootechnicien en charge de la mise en reproduction. Lors de ces observations, on vérifie la capacité de l'animal à s'alimenter, son comportement et sa vivacité, l'état du pelage. Toutes les anomalies et remarques sont notées par le zootechnicien dans un registre informatique accessible en ligne par l'expérimentateur et les personnes en charge du bien-être animal. Un échange quotidien entre le zootechnicien et l'expérimentateur permet une intervention et une prise de décision rapide.

Réduire : Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, un minimum de 3 trios de souris (1 mâles et 2 femelles par cage) seront utilisés pour produire la première génération (F1) de souris désirée qui produiront 40 animaux et 6 trios (1 mâles F1 et 2 femelles par cage) pour produire la deuxième génération (F2) qui produiront 80 animaux. Ensuite, pour maintenir la lignée, seulement 2 trios (1 mâles F2 et 2 femelles par cage) seront hébergés en continu.

Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 145 animaux pour chaque lignée ($3 \times 3 + 40 + 6 \times 2 + 80 + 2 \times 2$), soit 435 animaux (145×3).

10681 Le contrôle des lots de vaccins est réalisé dans le cadre de la procédure de libération européenne EBRP en vigueur et selon les référentiels réglementaires et des méthodes validées.

La détermination de l'activité de lots de vaccin contre le Tétanos, est réalisée sur le produit au stade de final vrac (avant conditionnement vente) dans le but de suivre la fabrication des vaccins contenant la valence tétanique selon un plan de contrôle établi par la Direction des Contrôles.

Ce test est réalisé *in vivo* selon une méthode décrite à la pharmacopée européenne (Pharmacopée européenne 2.7.8 « titrage de l'activité du vaccin tétanique adsorbé », Méthode B « épreuve de virulence sur souris et méthode paralysante ») et fait donc l'objet de cette saisine. Les méthodes de la pharmacopée ont été validées par les laboratoires européens à partir d'essais collaboratifs pour éviter que chaque laboratoire ait à revalider les méthodes (souche d'animaux, nombre, dose, injection, prélèvement, ...) ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale. Par ailleurs, dans la mesure du possible, nous nous efforçons de regrouper les analyses de produits afin de réduire également le nombre de souris utilisées. Pour limiter la douleur animale, un point limite de paralysie de l'animal a été défini au-delà duquel l'animal est euthanasié. Les souris sont hébergées dans des cages de 740 cm² à raison de 8 souris/cages. Les souris disposent d'une maison en plastique et de lamelles cartonnées ou de carrés de cellulose. Les souris sont surveillées quotidiennement (week-end et jours fériés compris). En cas d'anomalie de la souris (par exemple anomalie du pelage ou perte de poids ou anomalie du comportement telle qu'une prostration, isolement), le signe d'alerte est noté et observé. La souris peut être alors isolée dans une autre

cage au besoin. En cas de souffrance avérée (association d'au moins 2 paramètres d'alerte), elle est euthanasiée.

Cette saisine est demandée pour une durée de 5 ans et, en se basant sur le programme prévisionnel 2018, utilisera environ 30 000 souris pour 5 ans.

10682 L'objectif général de ce projet est la production de modèles animaux pertinents pour l'étude du rôle des protéines de la polarité cellulaire et planaire (PCP) dans le cerveau au cours du développement et à l'âge adulte. Les protéines de la PCP contrôlent et coordonnent l'orientation des cellules dans l'espace nécessaire à l'élaboration des organes. Dans le cerveau, il existe une protéine de la PCP, Prickle 2 (Pk2), qui interagit sur la polarité neuronale, l'arborisation dendritique, le nombre de synapse et la taille de la densité post-synaptique. Les simples mutants pour le gène Pk2 que nous souhaitons étudier sont létaux aux stades embryonnaires. Le système Cre-lox nous permet une mutagenèse ciblée des gènes dans certains tissus sans perturber le développement du reste de l'animal. Dans ce système le génome de souris dites « Cre » a été modifié afin d'exprimer la recombinaison Cre sous le contrôle d'un promoteur spécifique. Cette enzyme est capable d'exciser des fragments d'ADN situés entre deux séquences particulières d'ADN : les sites « loxP ». En croisant les souris « Pk2-loxP » avec les souris « Cre » on obtiendra des souris chez lesquelles l'enzyme Cre excise le gène Pk2 de l'ADN. Afin de contrôler la délétion du gène Pk2 dans l'espace-temps on utilise divers promoteurs spécifiques de la Cre recombinaison : le promoteur CAMKII qui permettra l'expression de la Cre recombinaison spécifiquement dans les neurones et à partir de la 3ème semaine postnatale ; le promoteur EMX1 qui permettra l'expression de la Cre recombinaison dans pratiquement tous les neurones du cortex cérébral à partir du jour embryonnaire 9,5 (E9,5) ; et le promoteur NEX qui permettra l'expression de la Cre recombinaison dans le néocortex et l'hippocampe à partir du jour embryonnaire 11,5.

Règle des 3R. Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. Raffiner : Le système Cre-loxP permet de réduire les effets défavorables résultant de l'ablation d'un gène et ainsi minimiser les effets négatifs sur le bien-être animal et limiter les décès pouvant être associés aux animaux knock-out (KO). En effet, la génération d'un animal KO consiste à « supprimer » un gène dans l'ensemble de l'organisme de l'individu. L'impact de cette altération dès l'embryogenèse et sur la totalité des organes peut entraîner des anomalies sévères pouvant conduire à des décès prénataux ou postnataux. Avec le système Cre-lox, la délétion du gène étudié peut être dirigée à la fois dans l'espace, c'est-à-dire dans un organe ou une structure spécifique de l'organisme, et dans le temps, c'est à dire à un stade particulier du développement de l'individu. Tous les animaux sont chacun observé fréquemment par le zootechnicien en charge de la mise en reproduction. Lors de ces observations, on vérifie la capacité de l'animal à s'alimenter, son comportement et sa vivacité, l'état du pelage. Toutes les anomalies et remarques sont notées par le zootechnicien dans un registre informatique accessible en ligne par l'expérimentateur et les personnes en charge du bien-être animal. Un échange quotidien entre le zootechnicien et l'expérimentateur permet une intervention et une prise de décision rapide.

Réduire : Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, un minimum de 3 trios de souris (1 mâles et 2 femelles par cage) seront utilisés pour produire la première génération (F1) de souris désirée qui produiront 40 animaux et 6 trios (1 mâles F1 et 2 femelles par cage) pour produire la deuxième génération (F2) qui produiront 80 animaux. Ensuite, pour maintenir la lignée, seulement 2 trios (1 mâles F2 et 2 femelles par cage) seront hébergés en continu.

Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 145 animaux pour chaque lignée ($3 \times 3 + 40 + 6 \times 2 + 80 + 2 \times 2$), soit 435 animaux (145×3).

10683 La leptospirose est une maladie bactérienne de répartition mondiale, à dominance tropicale. En France métropolitaine, elle touche environ 600 personnes chaque année. L'incidence est de 50 à 100 fois plus élevée dans les régions tropicales. On estime à plus d'un million le nombre de cas

sévères de leptospirose par an dans le monde avec un taux de mortalité supérieur à 10 %. Les personnes particulièrement à risque sont celles ayant un contact rapproché avec les rongeurs sauvages ou l'eau contaminée par leurs urines. Elle touche ainsi, par exemple les égoutiers, les pêcheurs ou le personnel de laboratoire dans les pays développés, mais aussi les victimes d'inondations dans les pays plus pauvres.

L'incubation dure en moyenne 4 à 14 jours. La maladie se caractérise par une phase initiale souvent non spécifique de type syndrome pseudo-grippal. Après quelques jours d'évolution, une atteinte multi-viscérale est possible : atteinte hépatique avec ictère, insuffisance rénale (50 à 70 % des cas), hémorragies (20% des cas), méningite (50 % des cas), atteintes neurologiques, complications oculaires...La létalité atteint 5 à 20 % sans traitement.

Un vaccin contre *Leptospira interrogans* sérovar *icterohaemorrhagiae*, groupe le plus pathogène pour l'Homme, existe et est commercialisé en France. Il est nécessaire de s'assurer de son efficacité dans un modèle animal d'infection par cette bactérie, notamment dans les cas suivants :

- Libération des lots produits pour commercialisation ;
- Vérification de la stabilité tout au long de la période de validité ;
- Evaluation de la biocomparabilité dans le cadre de modifications du processus de production.

De plus, dans le cadre d'études de protection croisée, l'efficacité du vaccin pourra être testée sur des souches d'un serogroupe autre que le serogroupe *icterohaemorrhagiae*. En effet, il existe de nombreuses souches (formes) de *Leptospires* responsables de la Leptospirose et ces souches sont géographiquement très localisées. Afin d'étendre les indications du vaccin déjà commercialisé, il est donc indispensable de démontrer la protection croisée du vaccin pour d'autres serogroupes présents hors France métropolitaine et DOM-TOM.

La gerbille est un des modèles couramment utilisé d'infection par *Leptospira interrogans* et le vaccin est connu pour être efficace dans cette espèce. Le principe de ces tests d'efficacité est de vacciner des animaux avec le lot de vaccin à tester (deux injections à 7 jours d'intervalle). Deux semaines après la deuxième injection, les animaux sont infectés expérimentalement par la bactérie. Leur taux de mortalité est alors comparé à celui d'animaux non vaccinés et infectés.

Durant les cinq années du projet, un total de 1000 gerbilles devrait participer à ces procédures. Cette estimation est basée sur l'effectif réellement utilisé dans les essais couverts par la précédente autorisation soumise pour le même projet et sur l'analyse rétrospective qui en a été faite sur les cinq dernières années (environ 200 gerbilles par an).

Dès leur arrivée, les animaux seront examinés pour s'assurer de leur bon état de santé. Ils seront suivis quotidiennement afin de détecter tout signe clinique de douleur et de détresse. Une attention particulière sera accordée à l'enrichissement du milieu de vie des animaux et à un hébergement en groupes sociaux pour respecter au mieux le bien-être des animaux et les comportements naturels (nidification, matériel pour ronger.).

10684 L'objectif général de ce projet est la production de modèles animaux pertinents pour l'étude du rôle des protéines de la polarité cellulaire et planaire (PCP) dans le cerveau au cours du développement et à l'âge adulte. Les protéines de la PCP contrôlent et coordonnent l'orientation des cellules dans l'espace nécessaire à l'élaboration des organes. Dans le cerveau, il existe une protéine de la PCP, *Scribble1* (*Scrib*), qui interagit sur la morphologie des neurones. Les simples mutants totalement délétères pour le gène *Scrib* que nous souhaitons étudier sont létaux aux stades embryonnaires. Le système *Cre-lox* nous permet une mutagenèse ciblée des gènes dans certains tissus sans perturber le développement du reste de l'animal. Dans ce système, le génome de souris dites « *Cre* » a été modifié afin d'exprimer la recombinase *Cre* sous le contrôle d'un promoteur spécifique. Cette enzyme est capable d'exciser des fragments d'ADN situés entre deux séquences particulières d'ADN : les sites « *loxP* ». En croisant les souris « *Scribble-loxP* » avec les souris « *Cre* » on obtiendra des souris chez lesquelles l'enzyme *Cre* excise le gène *Scrib* de l'ADN. Afin de contrôler la délétion du gène *Scrib* dans l'espace-temps on utilise divers promoteurs spécifiques de la *Cre* recombinase : le promoteur *CAMKII* qui permettra l'expression de la *Cre* recombinase spécifiquement dans les neurones et à partir de la 3ème semaine postnatal ; le promoteur *EMX1*

qui permettra l'expression de la Cre recombinase dans pratiquement tous les neurones du cortex cérébral à partir du jour embryonnaire 9,5 (E9,5) ; et le promoteur NEX qui permettra l'expression de la Cre recombinase dans le néocortex et l'hippocampe à partir du jour embryonnaire 11,5.

Règle des 3R. Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. **Raffiner :** Le système Cre-loxP permet de réduire les effets défavorables résultant de l'ablation d'un gène et ainsi minimiser les effets négatifs sur le bien-être animal et limiter les décès pouvant être associés aux animaux knock-out (KO). En effet, la génération d'un animal KO consiste à « supprimer » un gène dans l'ensemble de l'organisme de l'individu. L'impact de cette altération dès l'embryogenèse et sur la totalité des organes peut entraîner des anomalies sévères pouvant conduire à des décès prénataux ou postnataux. Avec le système Cre-lox, la délétion du gène étudié peut être dirigée à la fois dans l'espace, c'est-à-dire dans un organe ou une structure spécifique de l'organisme, et dans le temps, c'est à dire à un stade particulier du développement de l'individu. Tous les animaux sont chacun observé fréquemment par le zootechnicien en charge de la mise en reproduction. Lors de ces observations, on vérifie la capacité de l'animal à s'alimenter, son comportement et sa vivacité, l'état du pelage. Toutes les anomalies et remarques sont notées par le zootechnicien dans un registre informatique accessible en ligne par l'expérimentateur et les personnes en charge du bien-être animal. Un échange quotidien entre le zootechnicien et l'expérimentateur permet une intervention et une prise de décision rapide.

Réduire : Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, un minimum de 3 trios de souris (1 males et 2 femelles par cage) seront utilisé pour produire la première génération (F1) de souris désirée qui produiront 40 animaux et 6 trios (1 males F1 et 2 femelles par cage) pour produire la deuxième génération (F2) qui produiront 80 animaux. Ensuite, pour maintenir la lignée, seulement 2 trios (1 males F2 et 2 femelles par cage) seront hébergés en continu.

Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 145 animaux pour chaque lignée ($3 \times 3 + 40 + 6 \times 2 + 80 + 2 \times 2$), soit 435 animaux (145×3).

10685 L'hypertension artérielle pulmonaire « L'HTAP », comme on la surnomme, est une maladie grave traitée par trois grandes familles de médicaments qui permettent d'améliorer la survie sans toutefois guérir définitivement les patients. On compte chaque année en France quelques centaines de nouvelles personnes touchées par cette pathologie rare. L'HTAP se caractérise par une hausse de la tension dans les artères pulmonaires qui vont du cœur aux poumons. Au fil du temps, les petites artères pulmonaires deviennent obstruées - un processus appelé remodelage vasculaire - en raison d'une production de cellules vasculaires incontrôlées. Cela entrave le flux sanguin et provoque une pression sanguine au niveau des vaisseaux pulmonaires plus élevée. L'essoufflement des patients devient chronique au moindre effort, et parfois même au repos. Le cœur droit se voit opposer une résistance de plus en plus forte à l'éjection du sang vers les poumons, et finit par défaillir.

De nouvelles approches thérapeutiques sont donc nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients. Le récepteur NMDA (NMDAR), un récepteur au glutamate connu par son rôle dans la plasticité neuronale et la transmission synaptique, a été récemment identifié comme acteur majeur participant à l'épaississement de la paroi des artères pulmonaire. Des composés chimiques ciblant le NMDAR sont en développement, et doivent être testés dans des modèles expérimentaux *in vivo* d'HTAP afin d'identifier un potentiel candidat médicament.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets bénéfiques des antagonistes NMDAR sur la pression sanguine et l'épaississement des vaisseaux sanguins pulmonaires ainsi que sur l'hypertrophie du ventricule droite dans l'HTAP expérimentale, afin de proposer une nouvelle classe de médicament ciblant les NMDARs périphériques de cette maladie chez l'homme.

L'utilisation des animaux de laboratoire reste incontournable dans cette pathologie et permet de retrouver l'ensemble des acteurs au sein d'un même modèle ainsi que les interactions très complexes entre le système respiratoire, cardiovasculaire, et immunitaire. Bien que les méthodes

alternatives utilisant des cultures cellulaires pulmonaires ont permis de sélectionner les composés actifs et d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués, de nombreuses questions issues des interactions multi-tissulaires dans la physiopathologie de l'HTAP ne peuvent trouver des réponses qu'en mesurant la pression sanguine et l'épaississement de la paroi artérielle pulmonaire *in vivo*. Le recours à l'expérimentation animale est donc indispensable pour valider l'efficacité de ces antagonistes NMDAR et à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. De plus, la législation impose la réalisation de telles études avant toute autorisation d'essais cliniques sur l'homme.

L'efficacité d'antagonistes NMDAR sera au préalable testée *in vitro* et seules les 6 molécules les plus efficaces seront testées *in vivo*. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés les molécules seront testées deux par deux afin de limiter le nombre d'animaux témoins. Enfin les antagonistes seront testés en traitement curatif en première intention et en préventif uniquement si le traitement curatif se révèle inefficace.

Au total 450 rats maximum seront utilisés sur 2 ans. Ce nombre d'animaux est suffisant pour mettre en évidence des effets qui seront statistiquement interprétables.

La réduction des effectifs est liée à l'utilisation de techniques d'évaluations du système cardiopulmonaire telle que l'échocardiographie, l'étude de la morphologie cardiaque et vasculaire pulmonaire et à une approche statistique adaptée (ANOVA et/ou test non-paramétriques).

Le raffinement se fait par une prise en compte du bien-être animal (enrichissement du milieu et soins quotidiens des animaux), une réduction de la douleur et la souffrance des animaux par l'utilisation d'anesthésie. La dose thérapeutique sera définie par des études préalables de tolérance et de toxicité en évaluation de la dose maximale tolérée. Les animaux sont observés quotidiennement pour l'apparition de signe de souffrance évalués selon une grille de score spécifique.

10686 La biopsie percutanée est un acte médical qui consiste à introduire une longue et fine aiguille à travers la peau jusqu'à l'organe cible, prélever un fragment de cet organe et le ramener à l'aide de l'aiguille. Ce fragment sera étudié par des examens microscopiques ou biochimiques pour mieux caractériser (grade d'un cancer, type d'agent infectieux...). La biopsie est un geste mini-invasif, c'est-à-dire qu'elle se fait généralement sous anesthésie locale et que le médecin suit le trajet de l'aiguille en direct à l'aide d'un échographe ou d'un scanner.

Les complications sont rares et peu sévères, sauf pour certains organes ou certaines populations. Des saignements peuvent survenir pour les biopsies hépatiques ou rénales et la biopsie pulmonaire peut engendrer un pneumothorax.

Pour limiter ces complications, on peut combler le trajet de l'aiguille avec un matériau dégradable qui est poussé après la biopsie à l'intérieur de l'aiguille et qui va gonfler pour remplir l'espace laissé vide par le prélèvement tissulaire. Actuellement, le comblement se fait avec des particules de gélatine découpées et modelées manuellement en "torpille" par le praticien au moment de l'intervention. L'utilisation de particules calibrées prêtes à l'emploi permettrait un gain de temps au radiologue et un plus grand confort pour le patient

L'étude proposée a pour but d'évaluer les performances de particules de gélatine calibrées ainsi que de vérifier leur résorption et leur tolérance à court et moyen terme.

Les essais réalisés pourront faire partie des dossiers réglementaires pour les demandes d'autorisation de mise sur le marché en Europe ou aux USA.

Les tests doivent être réalisés dans les mêmes conditions que chez l'homme. Ils sont par conséquent effectués sur des animaux de grande taille (mouton).

Les animaux proviennent de centres agréés et sont nés/élevés en captivité. L'étude portera sur un nombre maximum de 27 animaux, pour une période de 5 ans.

Les particules sont injectées par l'aiguille de biopsie après avoir pratiqué des ponctions dans le poumon et dans le foie sous contrôle d'imagerie (CT-scanner ou échographie).

Principe des 3R :

- Remplacement : Un certain nombre de conditions du vivant ne peuvent être modélisées dans des systèmes *in vitro* : contact avec le sang, réaction tissulaire et hémostasie à court et à long terme, tolérance et toxicité systémique, ce qui implique le recours à l'animal vivant.
- Réduction : L'estimation du nombre d'animaux utilisés est basée sur le nombre d'animaux nécessaire pour une analyse statistique pertinente. Ce nombre est au minimum de 3 individus différents par produit et condition. On prévoit un 4ème animal de secours pour chaque produit pour conserver un nombre suffisant en cas de problème. On effectue plusieurs biopsies par animal afin d'augmenter la puissance statistique et réduire le nombre total d'animaux.
- Raffinement : La procédure de biopsie/injection est réalisée sous anesthésie générale. Des analgésiques seront administrés systématiquement au moment des procédures. Un contrôle par scanner 2h après la procédure permet de vérifier l'absence de complications majeures (hémorragie ou pneumothorax).

10687 L'influenza D (INFD) est un orthomyxoviridae isolé pour la première fois aux USA en 2011. Identifié la première fois chez le porc, des études ultérieures ont montré qu'il était présent chez les bovins avec des séroprévalences élevées, suggérant que les bovins étaient l'hôte réservoir.

Notre équipe a identifié pour la première fois ce virus à partir de prélèvements respiratoires de veaux atteints de bronchopneumonies infectieuses. Nos études préliminaires réalisées suggèrent aussi que la prévalence sérologique de l'infection serait élevée en France.

Généralement, la pathogénie des virus respiratoires est difficile à reproduire expérimentalement, en raison de critères méthodologiques mais aussi parce que de nombreux agents interviennent en synergie dans les conditions naturelles et sur un terrain prédisposé. Le virus influenza D (IDV) a été détecté dans les cavités nasales, à des fréquences significativement plus importantes chez les veaux souffrant de problèmes respiratoires par rapport à des veaux sains. Les données récentes d'infections expérimentales suggèrent que l'IDV possède un tropisme respiratoire haut et bas chez le veau mais qu'il n'induit que des signes cliniques modérés sans mortalité. Par ailleurs sur le terrain les données diagnostiques lors de bronchopneumonie indiquent que ce virus est très étroitement associé à un autre pathogène respiratoire, *Mycoplasma bovis*, y compris dans l'appareil respiratoire bas. Les études sur les associations, collaborations entre pathogènes respiratoires sont peu nombreuses mais en plein essor. Aucune donnée n'existe sur les interactions entre l'IDV et le *M. Bovis*.

L'objectif est de définir si *M. Bovis* et IDV coopèrent entre eux pour favoriser l'infection et la maladie. Ces données permettront :

- De déterminer l'impact des co-infections respiratoires lors de bronchopneumonie avec des applications en termes de diagnostic et vaccination.
- De déterminer le rôle de la réponse immunitaire innée antivirale pour cibler des voies ou molécules avec des applications thérapeutiques.
- D'établir un modèle de co-infection expérimentale qui puisse être utilisé pour des futures études de pathogénicité mais aussi d'efficacité -innocuité vaccinale.

Un maximum de 32 veaux mâles sera donc nécessaire pour mener à bien ce projet.

Remplacement : il s'agit d'une étude visant à étudier le pouvoir pathogène d'un virus émergent chez son hôte naturel. Il n'existe aucun modèle, *in vitro* ou *in silico*, permettant de répondre à cette question.

Réduction : Les études préliminaires ont permis de déterminer le nombre optimal d'animaux par lots (8). Ce nombre d'animaux est suffisant pour répondre aux questions posées

Raffinement : Les veaux seront hébergés en groupes sociaux et bénéficieront de logettes équipées de tapis adaptés ainsi que d'une aire d'exercice. Chaque animal de l'étude permettra de collecter des données sur un nombre important de paramètres (immunologique, hématologique, physiologique et physiopathologique).

Le suivi biquotidien des animaux par un vétérinaire pendant toute la durée de l'étude, la définition d'un point limite et le conditionnement des procédures à l'état de santé des animaux contribuent à

réduire la douleur et le stress. L'utilisation de bollus ruminants pour l'enregistrement en temps réel de la température corporelle, permettra de réduire les manipulations des animaux et assurera un suivi fiable et direct de ce paramètre. Enfin, le milieu sera enrichi de brosse permettant aux animaux de se gratter le dos et les flancs.

10688 Face aux besoins croissants de remplacement articulaire et de comblement osseux (population vieillissante, chirurgie maxillo-faciale), les biomatériaux implantés doivent présenter des propriétés d'ostéointégration permettant d'accélérer la régénération du tissu osseux. Différentes stratégies sont alors envisagées notamment dans le traitement des surfaces des matériaux implantés pour optimiser l'interface os/implant. Il s'agit de proposer aux cellules hôtes (cellules osseuses) un biomatériau le plus « intelligent » possible. Pour cela, une des voies récentes consiste à fonctionnaliser la surface des biomatériaux par des traitements biomimétiques (topographie, matrice...).

Ainsi, notre projet porte sur l'évaluation de l'ostéointégration de biomatériaux osseux (métaux, polymères ou céramiques). Plus précisément, il s'agit d'évaluer le potentiel ostéogénique de revêtements peptidiques et/ou polysaccharidiques, naturels ou semi-naturels, choisis pour leur caractère biomimétique puisqu'ils sont naturellement présents dans la matrice osseuse et/ou cartilagineuse. Il s'inscrit dans une démarche analogue à l'évaluation biologique des dispositifs médicaux, telle que définie dans l'ISO 10993.

Ce projet fait suite aux études de cytocompatibilité que nous avons préalablement menées *in vitro* sur des cellules pré-ostéoblastiques de souris, dont les résultats tout à fait prometteurs nous conduisent naturellement à envisager une évaluation *in vivo* par implantation en site intra-osseux (intracrânien) chez la souris. L'ensemble du projet nécessitera d'utiliser 208 souris femelles. Ce nombre prend en compte un effectif suffisant pour :

- une approche statistique fiable permettant d'établir des conclusions pertinentes. Dans la mesure du possible et en raison des mesures répétées liées à la procédure d'imagerie, une analyse statistique utilisant des tests paramétriques sera utilisée ;
- avoir un nombre d'animaux répondant aux critères d'inclusion de l'étude suffisant à savoir le maintien en place des implants pour une durée de 10 semaines.

L'étude prendra en compte le principe des 3R. Dans ce contexte, l'imagerie *in vivo* sera cruciale car elle autorisera un suivi longitudinal sur toute la durée d'une expérimentation et sur tous les animaux, sans avoir à les euthanasier à chaque point de cinétique. Ainsi, une évaluation non invasive de la régénération du tissu osseux permet de limiter le nombre d'animaux. L'imagerie permettra aussi une sélection des animaux afin d'exclure tout animal dont les résultats ne pourraient être exploitables. Enfin, les études préliminaires exhaustives *in vitro* ont permis d'optimiser les conditions expérimentales et ainsi de sélectionner les meilleures fonctionnalisations de surface pour les tests *in vivo*. Le recours à l'expérimentation animale permettra maintenant de répondre à notre problématique de régénération tissulaire complexe et systémique.

L'ensemble des protocoles expérimentaux ont été conçus pour minimiser la souffrance et la détresse des animaux. Les souris seront hébergées dans des conditions conformes à la réglementation en vigueur dans un environnement enrichi. Une évaluation quotidienne des animaux sera réalisée et des points limites définis. Des mesures thérapeutiques seront prises le cas échéant pour traiter les animaux présentant des signes cliniques de souffrance.

Cette étude *in vivo* viendra compléter nos précédentes études *in vitro* et devrait nous permettre de pouvoir statuer sur les potentialités de développement de ces revêtements pour des applications orthopédiques, maxillo-faciales et/ou odontologiques.

10689 Ce projet d'expérimentation animale s'inscrit dans le cadre de la continuité d'un projet collaboratif dont l'objectif est d'améliorer la couverture vaccinale canine face à l'émergence de nouvelles souches de leptospires. Après avoir isolé de nouvelles souches de leptospires sur le terrain et les avoir caractérisées, divers antigènes candidats en ont été extraits et sélectionnés pour leur potentiel à déclencher une réponse immunitaire favorable, durable et cross-protectrice. Ce potentiel doit être

mesuré *in vivo* sur un modèle animal de la leptospirose déjà mis au point et éprouvé : le hamster Golden Syrian. Il est nécessaire de tester *in vivo* les antigènes candidats afin de constater ou non leur capacité à établir une réponse immunitaire favorable lors de l'exposition aux souches de leptospirose pathogènes.

Après avoir été vaccinés avec les antigènes candidats, les animaux recevront une dose calibrée de souche de *Leptospire* permettant de mimer au mieux les conditions naturelles d'une infection, puis ils seront suivis quotidiennement. Le taux de survie obtenu dans les groupes d'animaux vaccinés sera comparé à la survie observée dans les groupes d'animaux inoculés sans vaccination préalable.

Le modèle animal choisi est le hamster Golden Syrian femelle. Toutes les phases d'hébergement et d'expérimentation animale seront réalisées dans une animalerie confinée aux conditions environnementales contrôlées. Tout sera mis en œuvre pour assurer la sécurité des manipulateurs et le bien-être des animaux. La quantité de nourriture et d'eau sera vérifiée quotidiennement et le changement de litière sera réalisé 1 fois par semaine.

Suite à l'infection expérimentale, un suivi clinique des animaux sera effectué deux fois par jour afin de suivre attentivement les points limites de chaque animal. Lorsqu'un animal sera détecté en souffrance, celle-ci sera limitée par une euthanasie anticipée au moyen d'une injection létale de barbituriques. Au total 300 hamsters seront utilisés dans ce projet permettant le test de 10 antigènes candidats contre 2 souches de *Leptospire*s. Dans la mesure du possible, plusieurs antigènes seront testés au cours d'un même essai, permettant de mutualiser le groupe contrôle non vacciné puisque ce sera la même souche d'épreuve utilisée. Ceci devrait pouvoir permettre de réduire le nombre d'animaux utilisés au final

10690 La greffe de cellules souches hématopoïétiques (= cellules permettant la production de toutes les cellules sanguines) est l'une des approches thérapeutiques dans le traitement de cancer du sang après une chimiothérapie. Dans le cas d'une allogreffe (les cellules souches hématopoïétiques d'un donneur compatible), une complication majeure peut apparaître : la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD : graft versus host disease). Cette maladie est due à la réaction immunitaire des lymphocytes T du donneur contre les cellules du receveur, les organes cibles étant essentiellement, la peau, le tube digestif et le foie. Les approches actuelles pour prévenir la survenue d'une GVHD reposent principalement sur des traitements immunosuppresseurs qui permettent de réduire l'activation des lymphocytes allo-réactifs (cellules du système immunitaire reconnaissant les cellules du greffon contre étrangères). Cependant l'utilisation de ces traitements demeure limitée à cause de leur toxicité et de leur absence de spécificité.

Ce projet a pour but d'étudier le rôle de certaines populations cellulaires, impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire dans la physiopathologie de la GVHD. Les nouvelles connaissances que nous acquerrons sur le comportement de ces différentes populations nous permettraient, d'une part, d'élargir le champ thérapeutique, actuellement très limité, de la GVHD et, d'autre part, d'induire une tolérance à long terme de la greffe de cellules souches hématopoïétiques chez les patients. En effet, ces différentes populations pourraient être utilisées comme traitement préventif et/ou curatif de cette maladie potentiellement mortelle.

Dans cette étude, nous utiliserons un modèle de GVHD humaine chez la souris immunodéficiente. L'injection de cellules sanguines humaines chez ces souris induit une réaction du greffon contre l'hôte qui se traduit en premier lieu par une perte de poids de l'animal.

Nous nous engageons à respecter la « règle des 3 R » comme suit :

-Remplacer : La GVHD étant une maladie complexe faisant intervenir de nombreux acteurs cellulaires et affectant de multiples organes, l'utilisation d'un modèle animal est indispensable. Aucun modèle *in vitro* ne permet de reproduire cette pathologie et l'accessibilité aux principaux organes cibles de la GVHD demeure très limitée chez les patients greffés. L'utilisation d'un modèle animal est absolument nécessaire pour l'étude des mécanismes d'induction et de régulation de cette maladie et ainsi l'identification de cibles thérapeutiques.

-Réduire : Nous réduirons le nombre d'animaux utilisés dans ce projet au minimum nécessaire et suffisant pour satisfaire la validité scientifique de l'étude, en particulier au niveau de l'analyse

statistique de type ANOVA qui nous permet des comparaisons multiples et de limiter le nombre d'animaux (10 souris par groupe) soit un total de 325 souris sur toute la durée du projet (3 ans).

-Raffiner : Les animaux seront pesés trois fois par semaine et évalués quotidiennement selon une grille d'évaluation comprenant différents aspects cliniques (posture et mobilité, poids, atteinte cutanée et diarrhées) et seront euthanasiés lorsque les critères d'arrêt définis sont atteints. Dès qu'un affaiblissement d'une souris est observé, de la nourriture gélatinée sera ajoutée dans la cage. De plus, les personnes participant au projet (animaliers ou chercheurs) seront qualifiées et auront suivi une formation adaptée à son niveau de participation aux expérimentations et à sa fonction. L'ensemble des souris seront euthanasiées au plus tard 8 semaines après le début de la procédure.

10691 Ce projet a lieu dans le cadre du recrutement de deux personnes au sein du pôle *in vivo* de notre laboratoire confiné.

Le but de ce projet d'un an est de former les personnes récemment recrutées à travailler en laboratoire confiné sur le modèle primate et ainsi pouvoir adapter leur compétence en animalerie conventionnelle aux conditions d'une animalerie confinée et ce dans le respect des règles de biosécurité en vigueur au laboratoire.

Les personnes en formation seront encadrées par l'équipe expérimentation animale, équipe expérimentée et habilitée à travailler en animalerie confinée. C'est un projet de formation sur l'espèce primate non humain (PNH) qui, contrairement à ce qui se fait normalement, se déroulera dans un laboratoire fonctionnel mais exempt de toute souche virale.

Habituellement, les arrivants suivent une formation théorique sur les conditions de travail et prennent connaissance de toutes les procédures en vigueur. Puis, ils suivent une formation *in vitro* et enfin la formation *in vivo* qui commence par une formation sur rongeur dans le laboratoire confiné. Par contre, la formation sur l'espèce primate ne peut se faire que sur animaux en protocole car il est impensable éthiquement de réaliser une formation sur PNH sains qui devraient ensuite être euthanasiés (aucun animal ne peut ressortir du laboratoire car potentiellement contaminé). Notre projet est donc de réaliser, exceptionnellement, la formation du personnel sur primate au sein de l'extension récente du laboratoire et de profiter ainsi de l'opportunité d'avoir un laboratoire fonctionnel sain à disposition pour former ces nouveaux arrivants sur le modèle primate et ce de façon identique à ce qui se fait en laboratoire abritant des souches virales. Ainsi ils bénéficieraient d'une formation complète, et précise sans risques pour eux et avec peu d'impact sur les animaux.

Conformité/exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

Ce projet comportera une procédure incluant 3 Macaques cynomolgus correspondant au nombre maximum d'animaux pouvant être hébergés par cage du laboratoire et répondant aux conditions optimales d'hébergement. Ce nombre est suffisant pour permettre à chaque personnel de manipuler les animaux à quatre reprises sans les affecter. Le début de protocole de formation ne se fera qu'après une période d'acclimatation de sept jours. Les animaux ne seront pas manipulés vigiles, uniquement sous anesthésie et ne subiront que des prises de poids, température et prélèvements de sang (une attention particulière sera portée lors des prélèvements de sang afin d'éviter la formation d'hématome grâce à de longs points de compression et la pose d'une pommade anti-oedémateuse locale). Des enrichissements de stimulation et alimentaire seront systématiquement utilisés. Ce projet de formation se déroulant dans un laboratoire exempt de toute souche virale, les animaux utilisés pourront être retournés au fournisseur et être réorientés vers un autre protocole.

10692 Le sepsis est défini comme la réponse inflammatoire inappropriée de l'hôte, secondaire à une infection sévère menaçant le pronostic vital. En effet, lors des infections graves, l'amplification non-contrôlée de la réponse pro-inflammatoire peut conduire à un choc septique et à la défaillance d'organes initialement non infectés (insuffisance rénale, insuffisance hépatocellulaire, encéphalopathie septique...). Le sepsis est la cause la plus fréquente de mortalité en réanimation, malgré les nombreux progrès de prise en charge effectués au cours des dernières années. Une des armes essentielles dont nous disposons afin de lutter contre les infections bactériennes est l'utilisation d'antibiotiques. Au-delà des propriétés antibactériennes des antibiotiques, de plus en

plus d'éléments portent à penser que certaines classes d'antibiotiques pourraient avoir un effet immunomodulateur propre modifiant leur efficacité. Cependant, les effets immunomodulateurs induits par les antibiotiques n'ont été que peu étudiés, et ce majoritairement *in vitro*. L'étude approfondie de ces mécanismes d'immunomodulation, ainsi que la découverte des molécules et des voies impliquées semble donc d'un intérêt majeur. L'endothélium vasculaire, monocouche cellulaire qui tapisse l'ensemble des vaisseaux de l'organisme, est un organe à part entière. Il a de nombreuses fonctions indispensables à la vie, notamment l'organisation de la réponse immunitaire en cas d'agression bactérienne. L'objectif de notre étude est de mettre en évidence les effets de différentes classes d'antibiotiques (B-lactamines, glycopeptides, quinolones et macrolides) sur les propriétés immunes de la cellule endothéliale. Ce travail pourrait aider les médecins à améliorer le traitement antibiotique au cours du sepsis en tenant compte du pathogène et de l'hôte.

En accord avec la règle des 3R, nous avons réalisé le maximum d'expériences *in vitro* (analyse des modifications de l'expression des molécules d'adhésion et de co-stimulation à la surface des cellules endothéliales induites par les antibiotiques). Néanmoins, le passage à des tests *in vivo* est indispensable pour confirmer les données retrouvées *in vitro*, car le sepsis est une pathologie complexe atteignant de multiples organes et survenant très rapidement après le début de l'infection. Le modèle murin de sepsis utilisé est obtenu par ponction ligature caecale réalisée sous anesthésie générale. Il sera utilisé pour analyser l'impact des antibiotiques sur les modifications phénotypiques de la cellule endothéliale, sur le recrutement et la différenciation des cellules immunitaires. Nous avons réduit le nombre de souris utilisés dans cette étude au minimum nécessaire et suffisant pour satisfaire la validité scientifique de l'étude, en particulier au niveau de l'analyse statistique. Ce projet nécessitera l'utilisation de 370 souris sur 2 ans. Une attention toute particulière sera portée au bien-être animal. Concernant la procédure chirurgicale, le niveau de gravité du sepsis des animaux est directement corrélé au nombre de perforations caecales réalisées. Il existe un risque faible de décès post-opératoire des animaux dans notre étude car il ne s'agit pas d'un modèle de létalité mais d'un modèle de sepsis. La douleur post-opératoire sera systématiquement contrôlée par administration d'analgésique (buprénorphine) per et post-procédure. Une surveillance rigoureuse quotidienne avant l'intervention puis pluri-quotidienne au cours des 48 heures post-opératoires sera réalisée (respiration, apparence générale, réaction aux stimuli). Quarante-huit heures après l'intervention, ou plus tôt en cas de mauvaise tolérance clinique relevée au cours de la surveillance post-opératoire (grille d'évaluation et points limites définis), les animaux seront euthanasiés par une méthode réglementaire. Les personnes participant au projet (animaliers ou chercheurs) seront qualifiées et auront suivi une formation adaptée à son niveau de participation aux expérimentations et à sa fonction.

10693 Ce projet concerne l'évaluation de produits immunologiques destinés à protéger une espèce de carnivore domestique contre une maladie mortelle.

La mise en œuvre de ce projet comporte une seule procédure expérimentale répétitive permettant d'évaluer l'efficacité de ces produits.

Ce projet est conçu en accord avec les textes en vigueur de la Pharmacopée Européenne et avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- un caractère de stricte nécessité : cette procédure ne peut pas, pour le moment, être remplacée par des méthodes alternatives car elle répond à l'obligation réglementaire d'être conduite sur l'espèce de destination du produit ;
- un nombre d'animaux envisagé par groupe dans le but d'obtenir des données valides. Au total, un nombre maximum de 96 carnivores domestiques sur 5 ans sera impliqué dans ce projet ;
- un hébergement des animaux en groupe avec présence d'enrichissement de manière à limiter le stress ;
- un recours à l'anesthésie générale, si nécessaire, pour garantir le bien-être animal
- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long des procédures ;

- du fait de la sévérité de la procédure, des points limites adaptés et précisément définis afin d'éviter toute souffrance des animaux.

10694 Le dialogue entre un organisme et son microbiote (ensemble des bactéries qui peuplent cet organisme) a de nombreux effets bénéfiques connus. L'organe pour lequel ceux-ci sont les mieux décrits est le tractus digestif, où le microbiote participe à la maturation des cellules intestinales et du système immunitaire, et joue un rôle protecteur contre certaines bactéries pathogènes.

Alors que l'on pensait le poumon stérile, de récentes publications démontrent l'existence de bactéries dans le poumon. Ce microbiote pulmonaire est encore très peu décrit, et son impact sur le poumon et la santé de l'hôte reste peu connu. De récentes études ont permis de montrer que la composition du microbiote pulmonaire était modifiée chez des enfants asthmatiques sévères par rapport à des sujets sains.

L'objectif de ce projet de recherche est d'étudier les effets bénéfiques de bactéries pulmonaires humaines dans la diminution de l'asthme allergique. Les animaux utilisés dans ce projet sont des souris C57BL/6, couramment utilisées pour étudier diverses pathologies respiratoires. Le projet, portant sur la relation entre l'hôte, les bactéries et des allergènes, met en jeu des interactions complexes, il est donc impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Lors de la conception du protocole expérimental nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Le projet prévoit ainsi le recours à un minimum nécessaire de 663 souris pour mener à bien ce projet. Lorsque le recours aux animaux est indispensable pour répondre aux questions scientifiques, leur nombre est justifié par les besoins d'analyses statistiques des résultats.

La première partie du projet a pour but d'utiliser des coupes de poumons (approche *ex vivo*) pour évaluer les propriétés immuno-modulatrices des bactéries pulmonaires humaines. Cette étape nous permettra de classer nos bactéries en fonction de leurs propriétés bénéfiques. 15 souris adultes seront nécessaires pour cette partie. Ces souris seront anesthésiées, les poumons seront prélevés puis elles seront euthanasiées. Cette première étape permet de réduire le nombre d'animaux car nous pouvons réaliser des coupes d'organes et tester plusieurs conditions de co-cultures (plusieurs types de bactéries, seules ou combinées par exemple). Elle permet de faire une sélection des bactéries ayant un potentiel effet bénéfique avec un minimum d'animaux.

Dans un deuxième temps, les bactéries les plus prometteuses (au maximum 12) seront testées dans un modèle d'asthme induit par un broyat d'acariens (HDM). Nous comparerons les réponses inflammatoires et immunitaires ainsi que l'évolution de l'asthme en fonction des bactéries testées. 72 femelles adultes gestantes qui donneront 576 souriceaux seront nécessaires pour cette seconde partie du projet. Nous ferons nos expérimentations sur des souriceaux car des études ont permis de souligner l'importance de stimuli bactérien durant la période néonatale. En effet, l'administration de bactéries pulmonaires spécifiques durant cette période influence la sévérité de l'asthme. Les souriceaux recevront l'HDM ainsi que les bactéries par voie intra nasale. Pour cela, nous appliquons une goutte de produit de 10µL à l'entrée de la narine et le produit sera aspiré de façon naturelle par l'animal. Nous utiliserons des groupes de 8 souriceaux ce qui est le minimum pour obtenir des résultats fiables. L'expérimentation devra être répétée avec un lot d'HDM différent car ce dernier n'est pas standardisé et il peut y avoir des différences de réponse en fonction des lots d'HDM utilisés.

Les résultats attendus permettront de sélectionner une ou plusieurs bactéries humaines ayant les capacités de réduire les effets de l'asthme. A la fin de cette étude, nous serons en mesure de générer des données sur la viabilité et le mode d'administration d'un futur probiotique en vue d'une amélioration des traitements pour l'Homme.

Pour favoriser le bien-être de nos souris, leur environnement est enrichi par l'ajout de bâtons de bois à ronger, de mouchoirs en papier pour la nidification, et de boîtes en carton où elles peuvent se cacher. En expérimentation, les animaux sont observés quotidiennement. Pour limiter au maximum le stress et la douleur, des points limites sont clairement définis à l'avance. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement

et de façon appropriée si un problème survenait. Compte tenu de la faible invasivité du protocole, aucune souffrance animale n'est attendue dans cette étude.

10695 La prédiction et l'amélioration de l'efficacité alimentaire chez les animaux d'élevage s'avèrent essentielles pour accroître la rentabilité de l'éleveur ainsi que pour diminuer les impacts environnementaux liés à l'élevage. Cette question est particulièrement importante chez les ruminants, qui présentent la plus faible efficacité alimentaire rencontrée chez les animaux de rente. Il est bien connu qu'il existe une variabilité individuelle non négligeable dans l'efficacité avec laquelle l'animal assimile l'azote alimentaire. Néanmoins, cette efficacité est coûteuse à quantifier et d'ailleurs difficilement mesurable dans des conditions d'élevage. Il s'avère donc essentiel de trouver des méthodes alternatives et faiblement invasives permettant de prédire l'efficacité alimentaire dans des conditions pratiques ou expérimentales même à l'échelle de la variabilité individuelle. De fait avoir recours à des bovins (animal cible) est obligatoire.

L'objectif de ce projet à 5 ans est la recherche de différents bio-marqueurs plasmatiques et fécaux qui soient corrélés avec la variabilité individuelle de l'efficacité alimentaire et de l'utilisation de l'azote chez le bovin (*Bos Taurus*, race Charolaise) en croissance – engraissement alimenté avec deux régimes de composition contrastée. En respect de la règle des 3Rs il est proposé de réaliser cette étude en minimisant le nombre d'interventions sur chaque animal (8 prises de sang au cours des 10 mois d'engraissement) en raffinant les conditions d'hébergement, conduite des animaux en lot et en stabulation libre (stabulation non entravée, animaux non attachés), et sur un nombre réduit mais suffisant d'animaux (n = 50 chaque année) pour mettre en évidence les relations recherchées. Un total de 50 animaux par an (capacité maximale de nos installations) sera utilisé au cours de 5 ans soit un nombre total de 250 animaux. De plus, les prélèvements ne devraient pas générer de souffrance à l'animal. Cependant, si des signes de douleur au moment du prélèvement étaient observés (agitation, sensibilité au toucher), la suspension des prélèvements serait décidée le temps que le problème soit résolu et un traitement symptomatique sera administré à l'animal en cas de douleur. De plus pour réduire la souffrance et tout risque d'infection lors de la réalisation de la procédure la plus invasive (prélèvement de tissu adipeux) sur l'animal, une administration d'un anesthésique local puis d'un antiseptique sera faite systématiquement au moment du prélèvement.

10696 Les maladies à transmission vectorielle représentent un défi majeur en matière de santé publique et de développement économique. La Réunion et les îles du sud-ouest de l'Océan indien (SOOI) ont été victimes ces dernières années d'émergences épidémiques de nombreuses arboviroses d'importance médicale. C'est par exemple le cas du chikungunya qui a frappé durement La Réunion et l'ensemble de la région surtout en 2006.

L'objectif de ce projet est d'examiner le rôle des moustiques vecteurs dans la dynamique de transmission des arbovirus dans les îles du SOOI. A cet effet, la compétence vectorielle des moustiques échantillonnés à la Réunion et dans d'autres îles du SOOI sera examinée. Les expériences pour mesurer la compétence vectorielle seront réalisées en laboratoire confiné de niveau 3, avec les virus Zika et le virus de la dengue. Nous effectuerons des infections expérimentales par gorgement des femelles de moustiques sur membranes artificielles. Le repas de sang infectieux sera composé d'un mélange de sang de lapin, de virus et d'ATP (Adénosine Triphosphate) utilisé comme phagostimulant. Différents tests effectués par un consortium de laboratoire de recherche travaillant sur ZIKA ont démontré que l'origine du sang utilisé affecte l'infection virale et la dissémination. Ces résultats démontrent que le sang de lapin a une efficacité optimale (en comparaison avec du sang de bœuf) de l'infection et de la dissémination du virus ZIKA. Aucune méthode alternative ne permet de répondre à notre projet.

Pour le projet nous utiliserons deux lapins KBL(NZW) mâles de 11 semaines que nous ponctionnerons toutes les semaines à tour de rôle car l'idéal c'est d'espacer de deux semaines les prélèvements pour chaque lapin en ne dépassant pas 10% du volume totale (environ 6ml pour un lapin de 1kg), l'animal ne subissant aucune contrainte notable due à une telle perte de sang. La quantité de sang nécessaire pour le projet ne nécessite pas plus d'animaux. La ponction de la veine marginale de l'oreille est la méthode à choisir chez le lapin. La vasodilatation, si elle est nécessaire,

sera provoquée par l'application d'une substance légèrement irritante (éthanol 70°) qui sera enlevée de l'oreille après le prélèvement de sang. Avant chaque prélèvement nous appliquerons du désinfectant (dakine) au niveau du site de prélèvement. Les lapins seront hébergés dans une animalerie agréée, et mis dans des cages adaptées avec un enrichissement comprenant mélange de fourrage ainsi que cube de bois. Lors des prélèvements les lapins seront disposés dans des cages de contention adaptées et seront manipulés par du personnel compétent. Une surveillance quotidienne par les zootechniciens sera effectuée. La perte de volume est compensée en quelques heures par un transfert de liquide de l'espace extra-cellulaire vers l'espace intra-vasculaire, ainsi que par une excrétion diminuée d'urine et par le fait de boire davantage.

10697 La naissance d'un individu est le moment de la mise en épreuve des reins. Suivant le degré de sévérité des malformations rénales, le nouveau-né meurt dans les heures qui suivent sa naissance ou quelques années plus tard. Si ces malformations sont moins sévères, l'individu développera des maladies rénales chroniques souvent associées à des maladies cardiovasculaires résultant du dysfonctionnement rénal. Pour ces patients atteints des maladies rénales au stade final, il n'existe aujourd'hui que deux thérapies. 1) la dialyse, extrêmement lourde de conséquences dans la vie quotidienne de l'individu et à un coût très élevé dans les dépenses de la santé public. 2) La greffe d'organe qui malheureusement est très limitée à cause de la rareté d'organe compatible.

Les malformations congénitales rénales ont pour cause des dysfonctionnements d'un ou de plusieurs gènes pendant la néphrogénèse. Notre but est d'identifier les gènes clés et de comprendre leur fonctionnement pendant la formation des reins. Une approche très efficace qui est à l'origine des découvertes les plus importantes sur le fonctionnement des gènes est la génération des modèles de souris qui nous permettent soit de récapituler des pathologies rénales soit d'identifier de nouveaux acteurs qui interviennent pendant la néphrogénèse. Or, l'utilisation de l'animal vivant pose un réel problème éthique à cela s'ajoute un coût très élevé du maintien de la colonie vivante et enfin le nombre de souris mutantes reste très limité dû aux altérations génétiques accumulées. Ce dernier point constitue un obstacle majeur pour l'avancement des projets étant donné que chaque démonstration scientifique n'est valide que par une signification statistique obtenue par l'utilisation d'un nombre suffisamment élevé d'échantillon à analyser.

L'ensemble de ces arguments nous a conduit à envisager la génération de structures multicellulaires tridimensionnelles appelées organoïdes à partir de cellules souches embryonnaires de souris (ESC). Pour obtenir des organoïdes de reins nous devons cultiver les ESC *in vitro* dans des conditions qui induiront leur différenciation en cellules rénales. Ces ESC devront tout en se différenciant récapituler chaque étape de la néphrogénèse pour produire au final un organoïde rénal fonctionnel capable notamment de filtrer le sang. De plus, on pourra aisément générer des organoïdes de reins mutants en introduisant la mutation du gène d'intérêt dans les cellules ES. Ainsi cette approche présente plusieurs avantages non négligeables, notamment elle évitera d'expérimenter sur des souris et constituera une source reproductible et non limitée d'organoïdes. Dans une première étape il nous faut tester la capacité de nos cellules différenciées *in vitro* à former des organoïdes de reins. Pour cela nous suivrons deux approches complémentaires :

1 Approche *In vitro* : nous avons déjà démontré que ces cellules ont la capacité de se différencier en cellules épithéliales du néphron. Nos résultats préliminaires sont encourageants mais à ce jour, cette approche à sa limite. En effet, dans l'environnement *in vitro* actuel le réseau de vascularisation ne se forme pas correctement et par conséquent les rudiments d'organoïdes formés *in vitro* ne sont pas fonctionnels.

2- Approche *In vivo* : Cette approche nous servira comme preuve de concept : Elle consiste en la réimplantation des cellules murines différenciées dans des souris immuno-déficientes (c'est à dire des animaux capables d'accepter des greffes). Dans ce but les cellules seront injectées en sous-cutané au niveau de la nuque des souris. Les animaux seront euthanasiés un mois plus tard (sauf euthanasie précoce en cas d'atteinte du point limite) et les organoïdes de reins ainsi formés seront analysés. Cette approche *in vivo* nous permettra de mettre en évidence la faisabilité de ce projet, à savoir la formation d'un rein fonctionnel composé de ses unités de filtrations (les néphrons vascularisés).

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous regrouperons nos expérimentations sur les échantillons prélevés. D'autre part, nous injecterons, en sous cutanés, l'agrégat des cellules de part et d'autres de la nuque de chaque souris, nous aurons donc deux implants par souris, (Réduction).

Afin de créer un réseau de vascularisation, outre que l'utilisation du modèle animal, nous envisageons une co-culture de la fraction de stroma vascularisée à partir du tissu adipeux (une source des cellules progénitrices d'endothéliales) avec nos cellules progénitrices du rein (Remplacement). Et à long terme, le cœur même de notre projet est de remplacer la souris par des organoïdes et de ce fait de diminuer considérablement l'utilisation de souris mutantes maintenues en colonies vivantes.

Nous porterons une attention particulière quant à la prise en charge de la douleur en administrant des antalgiques. Nous compléterons le traitement anti douleur par une dose anti inflammatoire dans les heures et les jours qui suivent l'injection. Les animaux seront surveillés quotidiennement par le responsable du bien-être et par les personnels de l'animalerie (points limites, état général...). (Raffinement)

Pour l'ensemble de cette expérimentation nous envisageons d'utiliser 40 souris.

10698 Le porc est une espèce prolifique et les porcelets naissent relativement immatures. Leur développement post-natal dépend grandement de la quantité et la qualité du lait qu'ils consomment. Le colostrum, tout premier lait produit par la truie, apporte énergie, nutriments, anticorps et facteurs de croissance indispensables à leur survie et leur développement précoces, leur santé et leur croissance. Ensuite le lait leur fournit tous les éléments nutritifs et des anticorps essentiels à leur croissance et leur santé jusqu'au sevrage. Maitriser la production de colostrum et de lait représente donc un enjeu majeur pour la filière porcine, notamment dans un objectif de bien-être animal et de réduction de l'utilisation des substances médicamenteuses. Ainsi, la recherche d'alternatives aux traitements anti-infectieux mobilise les différents acteurs de la filière afin de répondre à l'enjeu du plan Ecoantibio2 2017-2021 visant à consolider la baisse de l'utilisation des antibiotiques obtenue lors du premier plan Ecoantibio (2012-2017). Parmi ces alternatives figurent les solutions préventives visant à favoriser la robustesse du porcelet en intervenant sur l'alimentation ou la conduite de la truie afin d'améliorer la qualité du colostrum et du lait. Dans cet objectif, un enjeu important pour la recherche est de comprendre les mécanismes de régulation de la synthèse du colostrum et du lait ainsi que de déterminer l'effet de l'environnement et l'alimentation des truies. Pour ces recherches, il est nécessaire de pouvoir étudier précisément la composition du colostrum et du lait. Des dosages validés existent pour de nombreux nutriments et de nombreuses molécules présents dans les sécrétions lactées de truie. Néanmoins il est nécessaire de développer de nouveaux dosages, notamment de la leptine et de l'IGF-I, deux hormones qui sont naturellement présentes dans le colostrum et qui stimulent la maturation des porcelets. D'autre part, comprendre les mécanismes de synthèse des sécrétions lactées nécessite aussi d'étudier le fonctionnement de la glande mammaire (et pas seulement la composition de ses sécrétions). Cela peut se faire sur du tissu mammaire prélevé par biopsie. Néanmoins, une alternative aux biopsies existe chez la chèvre et la vache, qui consiste à étudier l'expression des gènes dans les cellules mammaires purifiées à partir du lait. Il est souhaitable de mettre au point cette alternative chez la truie.

L'objectif de ce projet est de collecter, ponctuellement, des échantillons de colostrum et de lait en vue de réaliser ces développements méthodologiques. Le projet sera mené dans le respect de la règle des 3R. Son objectif et son contexte, à savoir améliorer la santé et la robustesse des porcelets, impliquent que l'approche soit réalisée sur des animaux vivants (Remplacement), de l'espèce porcine (Remplacement), dans des conditions d'élevage contrôlées (Raffinement). Les prélèvements de colostrum et de lait seront réalisés à 2 ou 4 stades de lactation, entre 2 et 4 au maximum. Le nombre de truies prélevées sera réduit le plus possible, notamment en prélevant des volumes de lait permettant de congeler du matériel pour des essais sans avoir besoin de prélever de nouveau (Réduction). Le nombre de truies nécessaires est de 25 au minimum. Ce nombre augmentera en cas de difficulté de mise au point méthodologique. Le nombre maximum de truies prélevées sera de 40. Les truies seront conduites selon les normes en vigueur, avec un suivi continu de leur performance et de leur santé. Toute intervention potentiellement douloureuse ou stressante

sera contrôlée, et les truies seront suivies dans les heures qui suivent. L'ensemble des procédures et des observations seront effectuées par du personnel expérimenté (Raffinement).

10699 Les muqueuses représentent la voie principale d'entrée de la majorité des agents pathogènes. La vaccination muqueuse permet l'induction de réponses immunitaires au niveau de ces muqueuses mais reste à ce jour inefficace.

Dans ce projet, nous souhaitons évaluer l'efficacité d'une nouvelle stratégie de vaccination basée sur un ciblage vaccinal des muqueuses à l'aide d'anticorps. Nous souhaitons en particulier étudier les réponses immunitaires induites par cette stratégie vaccinale chez la souris.

Ces études ne peuvent se faire *in vitro* car le but est de suivre l'activation physiologique du système immunitaire de l'animal après immunisation par voie orale, nasale, sous-cutanée, intradermique, et sublinguale. Le modèle murin est un modèle de référence pour évaluer la réponse humorale.

L'objectif de ce projet est pédagogique : former des étudiants en Master aux suivis de réponses immunitaires chez la souris.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum sans entraver l'interprétation des résultats et leur significativité au plan statistique.

Le nombre total de souris a été fixé à 30 souris par promotion, à raison d'une souris par étudiant sur une promotion de 30 étudiants. Donc 30x5 ans = 150 souris au total.

Cet effectif a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique des résultats. Les prélèvements sanguins des animaux s'effectueront sous anesthésie générale.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude.

La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et géré grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie / analgésie).

Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 4) ; dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger).

Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "*ad libitum*" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

10700 L'objectif de l'étude est de définir une zone de dégradation de la paroi aortique entre l'aorte saine (non anévrismale) et l'aorte pathologique (anévrismale) dans un modèle murin d'anévrisme de l'aorte abdominale par l'évaluation des propriétés biomécaniques de la paroi en imagerie par résonance magnétique (IRM).

50 animaux seront utilisés pour ce projet.

La formation d'un anévrisme de l'aorte sera induite chez un groupe de souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE KO) par l'implantation d'une mini pompe osmotique en sous cutanée diffusant de l'angiotensine II (Ang II) à la dose de 1000 ng/min/kg pendant 28 jours. Les résultats seront comparés à ceux d'un groupe contrôle de souris ApoE KO avec une mini pompe osmotique diffusant une solution saline isotonique.

Trois zones aortiques seront analysées en imagerie par résonance magnétique (IRM) :

- une zone d'aorte sans anévrisme,
- une zone anévrismale à l'endroit où le diamètre anévrisimal est maximal,
- une zone intermédiaire, appelée collet aortique, entre les 2 zones.

Nous réaliserons une étude comparative de différents paramètres mesurés en IRM entre les trois segments aortiques. Les IRM seront réalisées à plusieurs temps de l'étude pour juger de l'évolution dans le temps des paramètres mesurés :

- une IRM initiale d'évaluation morphologique,
- une IRM à 14 jours et à 28 jours pour l'ensemble des animaux

-une IRM à 43 jours et à 57 jours pour les animaux randomisés dans le groupe suivi sur 2 mois.

Afin de vérifier les résultats issus de l'imagerie, une analyse histologique des segments aortiques sera réalisée ultérieurement après euthanasie des souris à 28 jours et 57 jours.

Nous espérons montrer que l'IRM est capable de délimiter une zone de dégradation aortique entre la zone d'aorte saine et la zone d'aorte anévrysmale. Les paramètres tels que l'élasticité et la perméabilité aortique du collet seraient diminués par rapport à ceux de l'aorte saine tout en étant moins altérés que ceux de l'aorte anévrysmale. L'objectif secondaire serait de définir les séquences IRM ciblées pour la pathologie anévrysmale et son analyse en routine. Le but, à plus long terme, serait d'étendre les indications de l'IRM dans la pathologie anévrysmale humaine et notamment pour évaluer la zone d'ancrage des endoprothèses aortiques afin d'optimiser leur positionnement et de limiter le risque d'endofuite de type 1.

Les dommages prévisibles pour les animaux sont la formation d'un anévrisme de l'aorte abdominale avec un risque de rupture et donc de décès. Le risque de rupture est évalué entre 10 et 25 % selon les études. Celui-ci est imprévisible.

Les animaux seront maintenus en vie uniquement pour la réalisation des IRM. Aucun animal ne sera maintenu en vie après le dernier IRM prévu afin limiter le nombre de rupture.

Le modèle animal choisi est la souris hyperlipidémique par déficit en apolipoprotéine E avec infusion d'Ang II car l'anévrisme développé possède les caractéristiques histologiques les plus proches de l'homme dans la pathologie anévrysmale. Il n'existe pas de modèles, autre qu'animal, permettant d'évaluer l'IRM dans la pathologie anévrysmale avec une corrélation par une analyse histologique. Notre approche expérimentale permet de réduire le nombre d'animaux utilisés, soit 50 souris au total pour ce projet. Grâce à l'IRM, nous pouvons évaluer les propriétés de l'aorte de façon répétée dans le temps. La mise en place d'une mini pompe osmotique ne requiert pas d'ouverture de la cavité abdominale, contrairement aux autres modèles murins d'anévrisme de l'aorte et ne nécessite pas de compétences chirurgicales complexes.

L'impact environnemental est pris en compte par une phase d'acclimatation de 2 semaines. Le bien-être des animaux est assuré par un hébergement en armoire ventilée, par cage de 3 ou 4 individus avec un enrichissement composé de matériel pour nicher et se cacher ainsi que des buches et des rondins pour ronger. Les conditions de température, lumière et humidité des cages sont contrôlées. Les animaux recevront de l'eau et de la nourriture *ad libitum*. Une personne est chargée du bien-être des animaux et une surveillance quotidienne est assurée.

La douleur est limitée par une anesthésie inhalée lors actes douloureux (mise en place de la mini pompe osmotique en sous cutanée), associé à une analgésie péri opératoire. L'angoisse liée à la réalisation de l'IRM est limitée par une anesthésie inhalée. La température corporelle sera maintenue à 37°C pendant l'examen grâce à une couverture chauffante ou grâce au système de refroidissement des gradients IRM. L'euthanasie au 28^{ème} jour et au 57^{ème} jours se fera par dislocation cervicale après anesthésie inhalée à l'isoflurane.

10701 Domaine en rapide évolution, les nanotechnologies ont contribué à d'importantes innovations en matière de thérapeutique, dans l'industrie et l'environnement. En particulier, les additifs de diesel formulés avec des nanoparticules de Cérium (NPCeO₂), actuellement largement utilisés en Europe et aux Etats-Unis en tant que catalyseur de combustion, permettent de réduire la consommation en fuel et les dégagements toxiques des gaz d'échappements. L'augmentation exponentielle des applications des NP amène cependant l'homme à y être exposé par voie respiratoire à des niveaux non négligeables. Les émissions atmosphériques ayant un effet délétère aujourd'hui avéré sur la fertilité, la question de l'évaluation de la balance bénéfique/risque de l'utilisation de ces additifs, et en particulier des NPCeO₂, constitue un questionnement majeur de santé publique.

L'objectif de ce projet est ainsi d'évaluer *in vitro* les effets d'une exposition aux NPCeO₂ à très faible concentration ainsi qu'aux hydrocarbures issus de la combustion du diesel, sur différentes cellules de la reproduction : spermatozoïdes, ovocytes, cellules folliculaires.

Ces cellules seront prélevées sur 78 rats femelles pré-pubères (et 9 rats mâles adultes, non décomptés car simple euthanasie réglementaire). Le recueil des ovocytes sur les femelles nécessite

une procédure expérimentale légère visant à stimuler l'ovulation par deux injections hormonales intra-péritonéales, avant euthanasie. Le recueil des spermatozoïdes sur les mâles ne nécessite aucune autre procédure avant euthanasie.

Ce projet respecte la règle des 3R au vue des considérations suivantes :

- au plan de la réduction, chez les femelles, la procédure de stimulation ovarienne permet d'obtenir un nombre supérieur d'ovocytes par rapport à une ovulation spontanée, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation.

- concernant le raffinement, des enrichissements des conditions d'hébergement des animaux seront mis en place tout au long de l'étude pour assurer leur bien-être (matériau de nidification nestlet, fond sonore). Les animaux seront ainsi hébergés à 2-3 par cage, par sexe, pour leur socialisation. Les points limites de l'étude seront définis selon les spécificités de chaque procédure. La réalisation de la procédure se fera à distance de cages hébergeant les animaux en attente de procédure afin de n'induire aucun stress.

- pour ce qui est du remplacement, les méthodes alternatives à l'expérimentation animale, de par leurs limitations techniques, ne peuvent pas répondre au questionnement concernant les effets des NP sur l'ensemble des paramètres qui seront analysés, nécessitant de fait le recours aux études *in vitro*.

10702 La capacité de garder en mémoire une expérience est essentielle pour la survie des organismes supérieurs. Cette capacité est en partie assurée par une structure cérébrale appelée hippocampe. Cette structure est composée de cellules appelées "neurones". Ces derniers sont connectés entre eux, et sont capables de modifier leurs connexions en fonction des informations qu'ils reçoivent, autrement dit, ils sont capables de « plasticité synaptique ». Les informations qu'ils reçoivent peuvent les activer ou les rendre silencieux. Toutes les informations reçues sont précisément intégrées de manière à coder et transmettre au mieux les messages nerveux.

Ces mécanismes sont connus pour être importants pour le stockage de la mémoire. Une des sous-régions de l'hippocampe (CA3) est impliquée dans la mémoire des événements vécus dans leurs contextes, appelée « mémoire épisodique ». Des modélisations par ordinateur ont permis d'émettre l'hypothèse que cette sous-région serait particulièrement importante pour développer la représentation instantanée d'un contexte.

Pour pouvoir confirmer ces hypothèses, il est nécessaire d'étudier le fonctionnement *in vivo* des circuits de neurones du CA3, ainsi que le rôle joué par la plasticité synaptique dans ses circuits. Pour se faire nous utiliserons un modèle animal transgénique dans lequel ces circuits sont affectés. Le projet propose d'étudier le fonctionnement des circuits du CA3 *in vivo*, à l'aide d'enregistrements de l'activité électrique des neurones chez la souris anesthésiée. Grâce à une technique appelée « optogénétique », il sera possible d'activer ou de rendre silencieuse une population de neurones en les stimulant avec de la lumière. Ces manipulations permettront d'enregistrer la réponse de certains neurones après activation et/ou inhibition d'autres neurones, et donc de mieux comprendre le fonctionnement des circuits du CA3 intacts. Nous étudierons également l'effet sur la mémoire à travers des expériences comportementales. Le projet utilise donc des approches fonctionnelles (électrophysiologie) et comportementales.

Le planning général des expériences comprend plusieurs étapes 1) la chirurgie stéréotaxique, 2) des expériences de comportement 3) un prélèvement de tissu vivant après anesthésie pour pouvoir réaliser des analyses électrophysiologiques *in vitro* sur tranche des circuits de la mémoire 4) des expériences électrophysiologiques *in vivo*.

Dans le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) les mesures suivantes seront prises : (1) Le même animal sera utilisé pour différents protocoles comportementaux afin de réduire le nombre total (réduction) ; (2) Les protocoles comportementaux seront suivis par des analyses immunohistochimiques afin de réduire et d'optimiser l'utilisation des animaux (réduction et raffinement) et (3) L'utilisation de systèmes simplifiés (neurones en cultures ou lignées cellulaires) ne peut reproduire le circuit neuronal. Dans chaque expérience, des précautions seront prises pour diminuer l'impact stressant et douloureux des procédures expérimentales (utilisation d'analgésiques

locaux, suivi postopératoire, régulation thermique, contrôle de la fonction respiratoire). La souris est une espèce de choix pour les études sur le système nerveux central des Vertébrés. L'organisation du système central de cette espèce est assez proche de celle de l'homme, ce qui permet une extrapolation des résultats obtenus. Nous utilisons le modèle souris qui est l'espèce de rongeurs permettant d'obtenir aisément des animaux modifiés génétiquement. Le modèle utilisé ici n'a pas de phénotype dommageable.

Les données électrophysiologiques sont difficiles à obtenir, l'expérience du laboratoire a montré que plusieurs animaux (4-5) sont nécessaires pour obtenir un enregistrement exploitable et en extraire des conclusions correctes. Les protocoles comportementaux exigent un minimum de 15 animaux par condition expérimentale. Pour la totalité de ce projet, 480 souris seront donc nécessaires et ce chiffre tient aussi compte des différents contrôles.

10703 L'apprentissage du langage oral humain repose sur l'existence d'un retour sensoriel en temps réel, principalement auditif mais aussi proprioceptif et visuel. L'acquisition des représentations phonologiques pendant l'enfance et leur maintien à l'âge adulte est dépendant du retour auditif permettant un rétrocontrôle. En effet, la dégradation progressive des représentations motrices phonologiques chez l'adulte devenu sourd après l'apprentissage de la parole est avérée, conduisant à une dysphonie caractéristique et à une baisse de l'intelligibilité de la parole. L'hypothèse actuelle est qu'un retour auditif, au moins partiel, est nécessaire pour contrôler de façon fine l'activité motrice de l'appareil vocal et ainsi moduler la hauteur et la durée des phonèmes ou des syllabes. Cependant, cette idée n'est soutenue que par des preuves indirectes fondées sur des études de cas chez le sujet humain et des études de surdité provoqu e chez l'oiseau qui ne testent pas cette hypothèse en particulier.

Hormis l'esp e humaine, ce comportement ne se retrouve que chez certains mammifères marins (cétacés, phoques), ou terrestres (chauve-souris, éléphants) mais est en revanche plus commun chez les oiseaux, en particulier les oiseaux chanteurs (remplacement), représentant environ la moitié des esp es d'oiseaux recens es dans le monde. Les oiseaux chanteurs possèdent un réseau de structures c erebrales impliquées dans l'apprentissage, la perception et la production du chant. Ils sont actuellement consid er es comme un modèle animal d'étude des bases neurales du langage ; leurs vocalisations présentant des points communs avec la parole humaine. Comme les humains, ils apprennent à produire des séries de signaux acoustiques ayant une structure acoustique et une organisation syntaxique.

Nous nous proposons d'étudier comment le rétrocontrôle auditif et non-auditif influence la performance vocale apprise chez le diamant mandarin. En particulier, nous voulons déterminer si la performance motrice pendant l'apprentissage vocal dépend exclusivement du rétrocontrôle auditif et si un rétrocontrôle visuel peut se substituer aux informations auditives. Si des données de littérature ont montré l'importance du rétrocontrôle auditif sur l'apprentissage des jeunes et le maintien du chant des adultes, aucune étude n'a précisément d emontr e le rôle de ce rétrocontrôle sur les capacités d'apprentissage à l'âge adulte.

Des études comportementales ont montré que le diamant mandarin peut modifier les caractéristiques spectrales et temporelles de son chant pendant une tâche d'apprentissage. De plus, une étude préliminaire men e par des collaborateurs a permis d'établir une méthode optimale de suppression du rétrocontrôle auditif pour influencer les performances vocales des oiseaux (raffinement). Cette étude préliminaire permet ainsi de réduire le nombre d'animaux à utiliser dans nos expériences (réduction). Nos expérimentations impliqueront donc un maximum de 100 oiseaux qui seront répartis dans 6 groupes d'étude différents.

Au cours de ces dernières années, des études neuro-anatomiques se sont int eress es au cerveau des diamants mandarins, un atlas stéréotaxique des différentes régions c erebrales impliquées dans le comportement de chant a été mis au point, ce qui nous permet de cibler nos études sur ces régions et ainsi de limiter le nombre d'animaux utilis es. Les expérimentations seront conduites sur un petit nombre d'oiseaux à la fois, ce qui permettra de ne collecter que le nombre de données nécessaires pour obtenir suffisamment de puissance statistique pour les résultats. Par ailleurs, pour les études impliquant des méthodes nouvelles, conduire les expériences sur un petit nombre

d'oiseaux à la fois nous permettra d'adapter le protocole expérimental au fur et à mesure des expérimentations.

L'étude du contrôle vocal des oiseaux nécessite qu'ils soient dans les meilleures conditions. Les oiseaux seront contrôlés au quotidien afin d'évaluer les niveaux potentiels de douleur et de souffrance. Un antalgique sera administré lors des anesthésies générales et tant que des signes extérieurs de douleur seront observés. Enfin, la décision de l'euthanasie des animaux à la fin des expérimentations ne sera pas systématique puisqu'elle dépendra des procédures que l'oiseau a subies.

10704 Les invasions biologiques sont maintenant considérées comme une des principales causes du déclin de la biodiversité et de la perte des services écosystémiques. Elles sont à l'origine de nombreuses actions de contrôle et de gestion coûteuses qu'il faut rationaliser pour optimiser l'efficacité des fonds alloués au nombre croissant d'espèces invasives sur le territoire français. Le projet vise à déterminer les stratégies représentant le meilleur coût-efficacité pour deux espèces d'amphibiens considérées comme des espèces invasives majeures pour les milieux aquatiques à l'échelle mondiale. Le Xénope lisse *Xenopus laevis* est une de ces deux espèces ciblées par le projet, aucun substitut n'est envisageable. Celle-ci a été introduite en France et est maintenant présente en Deux-Sèvres et en Maine-et-Loire. C'est dans ce cadre que s'inscrit la présente demande. Pour déterminer les stratégies de contrôle, les caractéristiques de la population invasive de *X. laevis* doivent être déterminées. Les *X. lisses* présentent un stade larvaire et un stade adulte aquatique dont les caractéristiques morphologiques, physiologiques et comportementales sont entièrement différents. L'étude des variations phénotypiques chez les adultes a été abordée dans le cadre d'une thèse. Les informations existantes sur le stade têtard sont limitées et très insuffisantes pour prédire la réponse des populations. Dans le cadre de ce projet de recherche nous devons répondre à plusieurs questions qui correspondent à plusieurs procédures sur têtards et adultes. La demande porte sur 5 procédures. Les individus pourront être utilisés dans plusieurs procédures.

1. Reproduction d'adultes (productions de têtards) - Pour obtenir les têtards nécessaires aux différentes expériences, nous utiliserons des adultes capturés en nature que nous injecterons avec de l'hormone choriogonadotrophine alpha selon une procédure déjà décrite dans la littérature. Les animaux sont maintenus dans des aquariums individuels puis des couples sont placés dans des aquariums de taille plus petite afin de faciliter la copulation. Les oeufs maintenus dans cet aquarium pendant les premiers stades et les parents déplacés à l'issue de la fécondation.

2. Phénologie du développement larvaire - Il a été montré que la reproduction et les capacités de dispersion des adultes sont modifiés lors de l'expansion de la population. Nous déterminerons si le développement des têtards est également modifié. Cette information est importante pour évaluer si les processus évolutifs portant sur ce stade facilitent ou freinent l'expansion de la population.

3. Néophobie et réponse anti-prédateur - Les espèces invasives peuvent également être les proies des prédateurs présents dans les milieux qu'elles colonisent. Connaître leur réponse à ces nouveaux prédateurs pour elles permet d'évaluer la capacité des prédateurs locaux à participer au contrôle des populations invasives. Nous étudierons ainsi l'effet de l'exposition au risque de prédation (indices olfactifs) sur l'activité motrice de têtards de Xénopes lisses. Ces tests n'impliquent pas de contacts physique avec les prédateurs.

4. Acclimatation thermique des performances larvaires - Le *X. lisse* est originaire d'Afrique australe où il est soumis à un régime thermique différent de celui de l'ouest de la France. Cela ne l'empêche pas de se reproduire au point de devenir invasif. Nous devons déterminer la capacité d'acclimatation des têtards à la température. D'une part, nous comparerons ces performances à celles des populations natives en Afrique du sud. Des expériences y sont actuellement menées. D'autre part, nous déterminerons la norme de réaction, c'est-à-dire la flexibilité de la réponse des têtards d'une population, à différentes températures. Nous nous focaliserons sur la performance de nage des individus, une caractéristique importante pour échapper aux prédateurs, et en particulier sur la réponse de fuite.

Nous avons réduit au maximum le nombre de sites échantillonnés qui nous permette de tirer des conclusions de la variabilité des réponses chez ces populations naturelles. Nous utilisons également un nombre de têtards par groupe aussi réduit que possible en considérant la variation des réponses individuelles, notamment en termes de courbe de croissance.

5. Connectivité et déplacement en milieu terrestre - Les X. lisses vivent essentiellement aquatiques mais ils sont également capables de se déplacer en milieu terrestre pour chasser ou changer de site (assèchement par exemple). Des distances allant jusqu'à 2 km ont été observées. Nous quantifierons les performances physiques des animaux sur les différents substrats qu'ils rencontrent (végétation herbacée, sol nu, litière forestière, asphalte). Il s'agit de mesurer le taux de déshydratation et le mode de déplacement sur ces différents substrats. Les tests seront menés sur des individus juvéniles issus des expériences menées dans les procédures 1 et 2, et sur des adultes capturés en nature.

Les animaux seront maintenus en aquarium individuel ou collectif (densités faibles) et sans restriction alimentaire en s'assurant d'une qualité constante de l'eau pour que le développement se déroule dans les meilleures conditions. Tout facteur perturbateur du développement non contrôlé expérimentalement risquerait de biaiser fortement les estimations des processus que nous étudions. Les tests de performances ne sont pas létaux et on s'attend à ce que les animaux retrouvent une activité normale dans leur aquarium d'élevage.

Nous limitons le nombre de sites échantillonnés et le nombre de pontes par sites au minimum possible tout en restant en mesure d'évaluer la variabilité de ces deux facteurs, ce qui est indispensable pour l'étude de populations naturelles. Nous aurons recours à des modèles mixtes permettant de tenir compte de cette structure des données et de limiter les tailles d'échantillon par groupe. Par ailleurs, nous utilisons quand cela est possible différents individus d'une même ponte pour réaliser plusieurs procédures et limiter ainsi le nombre d'adultes. Les animaux sont euthanasiés par surdose de tricaine méthanesulfonate (MS222), une des méthodes recommandées pour les amphibiens.

Au total 1446 individus, soit 126 adultes et 1320 têtards de X. lisse, seront utilisés pour l'ensemble des procédures

10705 Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie chronique qui se traduit par une élévation prolongée de la concentration en glucose dans le sang (hyperglycémie) et apparaît lorsque l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline, hormone qui régule la concentration de sucre dans le sang, qu'il produit (ou insulino-résistance). Le diabète de type 2 représente la majorité des diabètes rencontrés dans le monde et touche actuellement près de 450 millions de personnes. Il est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale et de la sédentarité. Le prédiabète est un état précurseur du DT2 au cours duquel s'installe une hyperglycémie modérée. Bien qu'augmentant le risque de développer un DT2, le pré-diabète est un état réversible.

Le prédiabète accompagne souvent la surcharge pondérale mais pas toujours. Des mesures simples d'amélioration de l'hygiène de vie telles qu'une alimentation équilibrée et la pratique d'une activité physique régulière peuvent être efficaces pour prévenir ou retarder la survenue du diabète de type 2. Cependant, ces changements peuvent être difficiles à mettre en œuvre et ne sont pas toujours suffisants, le développement d'autres approches thérapeutiques apparaît donc nécessaires.

Le prédiabète est aussi largement suspecté d'être le résultat de l'inflammation de nombreux tissus (intestin, foie, tissu adipeux). L'objectif de notre projet est d'explorer les propriétés potentiellement protectrices de souches bactériennes naturellement présentes dans l'intestin et connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires sur l'hyperglycémie et l'insulino-résistance dans un modèle *in vivo* de prédiabète induit par un régime riche en glucose ou riche en graisse. Pour cela différentes souches bactériennes inactivées ou non par la chaleur seront administrées à des souris (C57Bl6) recevant soit un régime riche en sucre soit un régime riche en graisses pendant 12 semaines, temps nécessaire pour induire le pré-diabète. Le choix des souches est basé sur des études préliminaires réalisées. Nous testerons 10 souches bactériennes sur 5 ans.

Deux procédures correspondant chacune à un régime seront réalisées sur le même schéma. La procédure 1 correspondant à l'administration du régime riche en graisses pendant 12 semaines impliquera 300 souris qui recevront par gavage oro-gastrique quotidien soit une souche commensale vivante (100 souris) soit la même souche inactivée par la chaleur (100 souris). Les souches seront testées 2 par 2 (2 souches vivantes et 2 souches inactivées), ce qui correspondra à un essai (chaque procédure comptera donc 5 essais). A chaque essai, un groupe contrôle positif de 10 souris recevra le régime riche en graisse et sera gavé avec une solution saline. De même, pour chaque essai un groupe contrôle négatif de 10 souris recevra le régime standard et sera gavé avec une solution saline. Pour chaque procédure 100 souris contrôles seront donc utilisées. De même, la procédure 2 concernant le régime riche en sucre impliquera également 300 souris, le groupe contrôle positif de 10 souris recevant le régime riche en sucre et étant gavé avec la solution saline. Le groupe contrôle négatif étant identique à celui mis en place pour la procédure 1.

Au total pour ce projet nous aurons besoin de 600 souris au maximum sur 5 ans. Le poids et la prise alimentaire des souris seront suivis 2 fois par semaine. Pour chaque groupe l'installation du pré-diabète sera suivie via des tests d'intolérance au glucose et d'insulino-résistance. Après 12 semaines au moment de l'euthanasie un prélèvement de sang sera effectué, puis suivi post-mortem par les prélèvements de différents tissus pour des analyses biologiques, histologiques et moléculaires. Cette étude de relation entre les bactéries du microbiote et l'hôte ne peut pas être réalisée *in vitro* ni modélisée *in silico*. Elle nécessite donc l'utilisation d'animaux. Le nombre d'animaux prévu est le minimum nécessaire pour effectuer des tests statistiques corrects (10 animaux par lot) sans nécessité de répétition ultérieure de l'expérience. Toutes les souris auront dans chaque cage un enrichissement de milieu par l'ajout d'un abri obscur en polycarbonate. Les souris seront 5 par cage pour éviter l'isolement. Les gavages seront réalisés par du personnel expérimenté. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

10706 L'accident vasculaire cérébral (AVC) est une atteinte neurologique soudaine, secondaire à une lésion vasculaire qui représente la troisième cause de mortalité. En France, il y a 130 000 nouveaux cas d'AVC par an dont 50% sont mortels. Les principaux facteurs de risques sont l'hypertension artérielle, le tabac, l'hypercholestérolémie, le diabète, et le vieillissement. Si la prise en charge rapide des AVC permet de sauver la vie de la moitié des patients, les lésions cérébrales induites restent souvent dramatiques pour les survivants et les AVC sont également la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans les pays industrialisés.

L'AVC peut être due à une obstruction de la circulation sanguine cérébrale, AVC ischémique (~80% des cas), ou à un saignement important, AVC hémorragique (~20% des cas). Dans l'un cas comme dans l'autre, la présence de microthrombi résiduels a été identifiée. Ces microthrombi peuvent être la cause d'une reperfusion incomplète de la circulation cérébrale et ainsi aggraver les séquelles et contribuer à un dérèglement physiologique local.

A l'heure actuel, il n'existe aucun moyen d'imager clairement l'intégralité des microthrombi chez les patients victimes d'un AVC. Il est possible d'évaluer leurs présences par des examens doppler transcrâniens pour détecter des signaux microemboliques. Cette technique est souvent couplée à une observation en IRM où les microlésions qu'ils engendrent potentiellement peuvent être vaguement distinguées. Ces 2 méthodes reposent sur la perturbation physiologique induites par les microthrombi et non sur leur réelle détection et sont donc très limitées en termes de sensibilité de diagnostic.

L'objectif de ce projet est de tester différentes stratégies pour imager ces microthrombi dans 3 modèles différents d'AVC thromboemboliques chez le rongeur. Les stratégies diagnostiques s'axent sur l'imagerie moléculaire (injection d'un agent de contraste en IRM) et la recherche de biomarqueurs (cible biologique) spécifiques des microthrombi.

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

Les agents de contrastes fonctionnalisés avec des anticorps spécifiques des plaquettes contenues dans les microthrombi ont été préalablement testés en chambre micro fluidiques afin de confirmer leur capacité à cibler des microthrombi obtenues à partir de sang humain.

La prochaine étape nécessaire pour tester cette stratégie est l'étude préclinique en IRM sur des modèles d'AVC chez la souris. Il n'y a pas d'autres solutions pour reproduire la complexité de la thrombose et de la circulation cérébrale que de tester notre modèle chez l'animal anesthésié.

La souris est une des espèces animales les plus étudiées dans le domaine de l'AVC. L'anatomie et la physiologie de la circulation cérébrale sont donc parfaitement connues. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature rend cette espèce particulièrement intéressante pour étudier la présence de microthrombi dans les modèles d'AVC.

Pour l'ensemble du projet, un total de 370 souris sont nécessaires.

Nous consultons un biostatisticien avant de procéder à de telles études pour s'assurer que nous utilisons le nombre minimal d'animaux pour atteindre le résultat souhaité. Dans ce projet, 40 souris seront nécessaires pour étudier la présence de microthrombi sans agents de contraste dans 2 modèles d'AVC, 210 souris seront nécessaires pour tester la méthode de diagnostic des microthrombi avec agents de contrastes IRM sur 3 modèles d'AVC en testant 3 biomarqueurs différents et 120 souris seront nécessaires pour mesurer la susceptibilité des microthrombi à la thromolyse. Ces modèles permettront par la suite de mieux comprendre l'ampleur, la localisation et l'accessibilité par les agents de contrastes des microthrombi.

Les animaux seront maintenus anesthésiés durant la chirurgie et tout au long de l'imagerie, puis seront euthanasiés en conformité avec la loi.

Les mesures pour réduire au maximum toute forme d'inconfort et de souffrance sont, outre celles mentionnées ci-dessus, le suivi strict et rapproché des animaux, l'hébergement en petits groupes sociaux stables (n=5) avec un enrichissement minimum (un rouleau cartonné + une feuille de papier essuie-tout), et la manipulation uniquement par des personnels expérimentés. Les animaux seront maintenus dans des conditions optimales d'hébergement, dans un environnement stabilisé en température (21°), hygrométrie (55%), luminosité (100 lux), et durée du cycle de lumière (12h/12h) et sont sous l'attention quotidienne du personnel de l'animalerie.

Mots clefs : accident vasculaire cérébral ; microthrombi ; imagerie moléculaire ; biomarqueurs.

10707 Les dernières années témoignent d'une remarquable accélération dans la compréhension des facteurs génétiques impliqués dans la déficience intellectuelle (DI), et de nombreux gènes responsables ont été identifiés, estimés à plus de 700 aujourd'hui. Toutefois, le lien entre les mutations à l'origine des DI et les dysfonctionnements cognitifs reste mal compris. L'une de nos hypothèses considère que certaines mutations à l'origine des DI affecteraient le développement de certaines structures cérébrales importantes pour les fonctions cognitives comme l'hippocampe.

Notre objectif est d'entreprendre une analyse de la formation, la mise en place et l'intégration des neurones (neurogenèse) au cours des périodes embryonnaires et post natale chez des jeunes souris modèles d'une maladie génétique humaine associées à une DI : le syndrome de Coffin-Lowry. Cette pathologie chez l'homme est due à des mutations d'un gène codant la protéine kinase RSK2. Des données récentes chez la souris modèle adulte convergent pour impliquer ce gène dans différentes étapes de la neurogenèse adulte, de la prolifération à la différenciation des neurones, suggérant que des altérations de cette neurogenèse conduiraient à des altérations des capacités cognitives. Notre futur projet déterminera si des altérations de la mise en place de la neurogenèse au cours de la période embryonnaire et post-natale sont également corrélées aux altérations cognitives dans ce modèle, et permettra d'identifier, très tôt au cours de la période de développement, de nouvelles cibles pour des approches thérapeutiques dans cette pathologie.

Les souris génétiquement modifiées requises pour ce projet sont les seuls modèles animaux de cette pathologie et les corrélations entre mécanismes cérébraux et capacités d'apprentissage impliquent une approche *in vivo*. L'effectif maximal de souris nécessaires à l'accomplissement du projet est de 688 (minimum 486). Afin de limiter le nombre de souris, des tests statistiques adaptés aux petits échantillons seront appliqués et les premières expériences auront pour but de démontrer la présence d'altérations de la neurogenèse dans ce modèle. Si ce n'était pas le cas, les expériences visant à préciser la nature des mécanismes responsables seront inutiles et le nombre de souris en sera d'autant réduit. L'approche expérimentale utilise des stratégies et techniques qui ont montré leur pertinence dans les récentes publications sur l'étude des corrélations entre mécanismes de neurogenèse et processus cognitifs chez la souris, et le projet a obtenu plusieurs sources de financement témoignant de sa pertinence et de sa faisabilité. Les protocoles utilisés sont en accord avec des procédures préalablement validées par le comité d'éthique (anesthésie, analgésie, euthanasie, réduction du stress et perturbations physiologiques au cours des tests comportementaux) et les soins apportés aux animaux (manipulations préalables à l'expérimentation, observations régulières des souris pour détecter des signes de détresse ou de souffrance impliquant l'arrêt de l'expérience) sont conçus pour éviter ou limiter au maximum toute souffrance physique ou psychologique.

10708 La douleur est un problème de santé publique qui diminue considérablement la qualité de vie des patients. D'importants progrès ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes de la douleur, en revanche, peu concernant le développement de nouveaux analgésiques. Ainsi à l'heure actuelle les opiacés restent le moyen le plus efficace utilisé pour le traitement des douleurs moyennes à sévères. Malheureusement ils sont peu efficaces pour le traitement des douleurs associées à une atteinte nerveuse (douleur neuropathique) et présentent de nombreux effets secondaires, parmi lesquels le développement d'une tolérance à leurs effets analgésiques, ce qui conduit inévitablement à une diminution de l'effet du traitement au cours du temps.

CXCL12 est une chimiokine produite par l'organisme qui joue un rôle important dans le développement de la douleur via son récepteur CXCR4. Nous avons récemment développé des molécules capables de bloquer l'action de CXCL12. L'objectif de ce projet est de tester plusieurs de ces molécules chez les rongeurs afin d'étudier le mécanisme d'action de CXCL12 dans la modulation de la douleur et d'évaluer leur potentiel thérapeutique pour le traitement de la douleur.

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer : les molécules sélectionnées ont été caractérisées au préalable *in vitro* pour leur activité et leurs caractéristiques physicochimiques. Cependant, l'évaluation de leur effet sur la nociception n'est réalisable aujourd'hui que sur l'animal entier.

Réduire : Compte tenu de la variabilité dans les différentes expériences prévues, le nombre d'animaux est limité à 10 par groupe, ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques.

Raffiner : Les animaux sont hébergés dans une animalerie dont le fonctionnement est conçu pour maximiser leur confort et limiter leur souffrance. En particulier, les animaux sont hébergés en cohorte, dans un milieu enrichi, et observés quotidiennement par l'expérimentateur ou une personne compétente. Les chirurgies seront toutes effectuées sous anesthésie et analgésie adéquat, et les animaux maintenus au chaud et surveillés jusqu'au réveil complet, avec traitement complémentaire analgésique.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet, partie 1 : 1440 souris C57BL6N

10709 Un dysfonctionnement du système immunitaire peut provoquer la rupture de la tolérance au soi et être à l'origine du développement de maladies auto-immunes. Ainsi, la connaissance approfondie des mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance représente un enjeu capital pour améliorer à la fois la compréhension et le traitement des maladies auto-immunes.

Le marqueur CD45RC permet de distinguer les cellules effectrices des cellules régulatrices. En effet, les LT CD4+ et CD8+ exprimant faiblement le marqueur CD45RC ont des propriétés

immunosuppressives telle que la sécrétion d'interleukine-34 (IL-34) une cytokine aux propriétés tolérogènes, alors que les cellules exprimant fortement ce marqueur ont un profil effecteur. Dans le cadre d'une allogreffe cardiaque chez le rat, l'injection d'un adénovirus codant pour CD40lg induit ces cellules CD4+ et CD8+ exprimant faiblement la molécule CD45RC à l'origine de la survie indéfinie du greffon. De plus, l'élimination des cellules effectrices par le ciblage du marqueur CD45RC à l'aide d'un anticorps permettrait, en agissant sur la balance du système immunitaire, de maîtriser les réponses immunes contre le greffon lors d'une greffe d'organe solide et les réactions du greffon contre l'hôte (GVH) lors de greffes de cellules hématopoïétiques.

L'objet de cette saisine est d'évaluer l'impact de la déficience en IL-34 sur la mise en place de la tolérance dans les modèles d'allogreffes cardiaque en association aux traitements CD40lg ou anticorps anti-CD45RC chez le rat Sprague Dawley et Brown Norway. De plus dans ces modèles, l'injection d'un AAV codant pour l'IL-34 sera réalisée dans le but d'analyser l'effet du rétablissement de l'IL-34 aux propriétés régulatrices.

L'utilisation du rat se justifie par de fortes similitudes génétiques et immunologiques avec l'Homme, et le choix de deux souches par le fait que les Brown Norway (BN) sont plus sensibles à l'auto-immunité ce qui permet d'améliorer les symptômes due à la déficience en IL34 (cytokine régulatrice) par rapport aux Sprague Dawley (SPD) mais ces derniers ont une capacité de reproduction nettement plus importante nécessaire à la réalisation des études.

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie :

-Remplacer : des études fonctionnelles ont été réalisées *in vitro*, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence de contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études *in vivo*.

-Réduire : le nombre d'animaux par groupe est réduit au nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de groupe a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total d'animaux est de 480 pour l'ensemble du projet sur les 2 souches.

-Raffiner : les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement seront euthanasiés. Durant le protocole, les animaux seront suivis pour le rejet de greffe. Tous les animaux, WT et KO seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post-mortem, au niveau anatomopathologiques pour le greffon et par immunohistologie pour étudier l'infiltration des cellules dans les tissus inflammés.

Les résultats obtenus permettront d'établir une preuve de concept quant au rôle de l'IL-34 dans les mécanismes inducteurs de la tolérance en transplantation.

10710 La prise en compte de la qualité de vie des patients traités pour un cancer est devenue primordiale. Depuis quelques années, la plainte de ces patients concernant, notamment, des troubles de la mémoire, de l'attention, des émotions a été décrite par les cliniciens et différentes études ont mis en évidence que les traitements du cancer pouvaient être directement responsables de ces altérations.

Le cancer de la prostate est le 2nd cancer le plus fréquent chez l'homme dans le monde. Des thérapies hormonales de nouvelle génération sont actuellement utilisées ou en cours d'étude dans le traitement du cancer métastatique de la prostate résistant à la castration (CPRCm). Peu de données sur les effets délétères de ces nouvelles thérapies anti-androgènes sur les émotions et les fonctions cognitives sont disponibles. Les androgènes, comme la testostérone, jouent un rôle majeur sur la structure et les fonctions de différentes régions cérébrales, importantes dans la régulation émotionnelle, l'apprentissage et la flexibilité comportementale. Il a été proposé qu'une diminution de testostérone joue un rôle dans le déclin des fonctions cognitives associé au vieillissement. La privation en androgènes induite par ces traitements du cancer pourrait ainsi accélérer le déclin cognitif associé à l'âge. Des études cliniques ont débuté récemment, visant à comparer les effets de plusieurs de ces nouveaux traitements sur les fonctions cognitives et la qualité de vie des patients CPRCm. En parallèle à ces études cliniques, une société pharmaceutique nous a sollicités, pour évaluer chez la souris âgée castrée, l'impact direct de 3 anti-

androgéniques et comparer leurs effets sur les émotions, l'apprentissage, la flexibilité comportementale.

Pour cela, nous allons travailler sur des souris castrées dont les conditions d'hébergement et d'expérimentation seront conformes aux normes recommandées. Les traitements débuteront après une acclimatation des animaux aux conditions d'hébergement et à la manipulation par l'expérimentateur. Les traitements anti-androgéniques seront administrés par voie orale quotidiennement pendant 6 semaines. Un total de 90 souris sera utilisé, avec 3 traitements anti-androgéniques différents et les 3 groupes contrôles correspondants, et 15 souris par groupe.

Durant toute la durée de l'expérimentation, un suivi des animaux sera réalisé notamment au moment de la pesée/administration des traitements et permettra de déceler un éventuel signe de souffrance (perte de poids importante, plaie).

Les effets des traitements anti-androgéniques sur les comportements de type anxieux, dépressifs, les performances d'apprentissage spatial, de mémoire spatiale, de flexibilité comportementale se dérouleront pendant 3 semaines, avec un test par jour et chaque test quotidien durera 10 min au maximum. Les animaux seront habitués à la pièce d'expérimentation pendant 30 min avant le début du test. A l'issue de chaque test, les animaux seront replacés dans leur cage d'hébergement avec leurs congénères. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, toutes les souris seront utilisées pour l'ensemble des évaluations comportementales. A la fin des expérimentations, ces animaux seront euthanasiés de manière réglementaire après anesthésie et leurs organes seront prélevés afin de réaliser des études biologiques permettant de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les éventuels comportementaux mis en évidence. Le projet, par ses objectifs, permettra d'apprécier les éventuels dommages infligés aux animaux en terme de souffrance, de douleur, et d'angoisse et, en définitive, bénéficier aux êtres humains et animaux. Les résultats de ce projet devraient permettre de guider les cliniciens dans le choix des thérapies anti-androgéniques et ainsi de privilégier celles qui tout en ayant un effet anti-tumoral ont le moins d'effets secondaires, mais également de proposer des prises en charge adaptées aux éventuels effets délétères mis en évidence.

10711 Les lots de vaccins anticoquelucheux sont contrôlés préalablement avant la mise sur le marché dans le cadre de la procédure de libération européenne et selon les référentiels réglementaires en vigueur. Les protocoles expérimentaux appliqués et les spécifications relatives à la qualité de ces vaccins sont décrits dans les monographies de la Pharmacopée européenne. L'efficacité des vaccins dépend de la réponse immunitaire de l'organisme, cette réponse ne peut être étudiée sur cellules isolées. Ces méthodes ont été validées par les laboratoires européens à partir d'essais collaboratifs pour éviter que chaque laboratoire ait à revalider les méthodes (souche d'animaux, nombre, administration, ...) ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale pour vérifier l'efficacité de ces vaccins. Par ailleurs, dans la mesure du possible, nous nous efforçons de regrouper les analyses de produits afin de réduire le nombre de souris utilisés. Les souris sont immunisées avec les vaccins puis après 4 semaines sont anesthésiées pour effectuer le prélèvement sanguin nécessaire au dosage immunologique. Les souris sont surveillées quotidiennement. Elles sont hébergées dans des cages IVC, ces cages renforcent le confinement sanitaire et limitent les bruits extérieurs et ainsi le stress des souris. Les souris disposent d'une maison en plastique et /ou de lamelles cartonnées ou des carrés de cellulose. La nourriture et l'eau de boisson sont contrôlés et disponible *ad libitum*. Cette saisine est demandée pour une durée de 5 ans et utilisera un maximum de 9000 souris

10712 La respiration est une fonction indispensable pour la survie. Des défauts de respiration sont fréquents, par exemple chez les patients atteints d'apnées de sommeil ou chez des nouveau-nés immatures, également, mais plus rarement, chez des patients atteints de maladies génétiques. Notre compréhension du contrôle de la respiration a progressé au cours des dernières années, mais elle est encore très incomplète. Nous appliquons les approches de génétique de la souris pour disséquer les circuits nerveux contrôlant la respiration chez les mammifères. Plus précisément, nous recherchons les caractéristiques moléculaires des neurones qui constituent le réseau

respiratoire chez la souris. Ce projet est plus particulièrement dédié à l'analyse de neurones qui sont actifs durant une phase précise de la respiration qui succède immédiatement l'inspiration : la phase dite post-inspiratoire au cours de laquelle se réalisent les très importants comportements de déglutition et de vocalisation.

Notre stratégie de caractérisation repose sur une identification des neurones par le type de neurotransmetteur qu'ils libèrent à la synapse et par le type de cellule embryonnaire (progéniteur) dont ils dérivent au cours du développement. Dans les deux cas cette identification repose sur des croisements génétiques par lesquels les expressions des gènes codant les caractéristiques moléculaires (type de neurotransmetteur et/ou type de progéniteur) sont directement visualisables par microscopie permettant ainsi le repérage spatial des structures nouvellement identifiées au sein du réseau neuronal respiratoire.

La règle des trois R sera suivie de la manière suivante. Réduction : Nous limitons le nombre de souris utilisées de trois manières : a) Nous travaillons sur l'animal néonatal ; dans ce cas, on peut obtenir plusieurs animaux du génotype souhaité par femelle gestante, et les animaux nés de génotypes intermédiaire peuvent être ultérieurement utilisés comme reproducteurs. b) Contrairement aux protocoles d'expérimentations dites fonctionnelles, les études anatomiques font l'économie de comparaison avec des individus contrôles. c) Nous travaillons sur des coupes de tissu permettant d'effectuer plusieurs analyses histologiques sur le même matériel. Raffinement : Les individus (nouveau-nés) destinés aux expériences de traçage seront opérés sous anesthésie par hypothermie, le traçage anatomique des 4 populations de neurones pré moteurs telles que choisies révélera sans doute des recouvrements anatomiques qui permettront une exploitation plus efficace des résultats. Nous observerons quotidiennement le comportement des animaux pour palier à toute souffrance éventuelle. Remplacement : un mécanisme physiologique complexe comme la respiration peut être étudié uniquement *in vivo* ou *ex vivo*. Ce projet utilisera 160 souris.

10713 Les gliomes sont des tumeurs cérébrales ayant une incidence de 4 à 5 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes. Il s'agit également du deuxième type de cancer le plus fréquent chez l'enfant. Les patients atteints de glioblastome, le plus agressif des gliomes, survivent en moyenne 14 mois après le diagnostic de la tumeur et ce malgré le traitement combinant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. C'est pourquoi il est nécessaire de chercher de nouveaux traitements. Notre projet s'inscrit dans ce contexte en utilisant une source de rayons X très particulière et encore expérimentale, de basse énergie mais de haut flux, permettant (i) de sélectionner au mieux les énergies intéressantes, et (ii) de faire un microfractionnement spatial de la dose. Ces deux spécificités ne sont pas techniquement possibles sur les sources classiques hospitalières à l'heure actuelle. Nous explorons le potentiel de cette technique depuis une quinzaine d'années déjà, selon différentes approches : simulation Monte Carlo, dosimétrie expérimentale, irradiation de cellules en culture. Ces approches bien qu'indispensables restent très limitées car elles ne prennent pas en compte la complexité du tissu tumoral, se développant de façon autonome, possédant sa propre vascularisation, etc. De fait, l'utilisation de modèles précliniques porcins permet de tester les modalités d'imagerie (diagnostique), les modalités d'irradiation (géométrie, balistique, dose) et les protocoles de thérapie visant à augmenter la sécurité du patient relativement à la dose délivrée (adjonction de médicaments anticancéreux) sur des tumeurs proches des tumeurs humaines.

Une des étapes indispensables pour la mise en place d'un nouveau protocole de radiothérapie est l'étude de la toxicité du traitement et ce projet permettra de tester la neurotoxicité à long terme de notre méthode sur le tissu cérébral sain. Ce projet est en parfait respect de la règle des 3R : remplacement, réduction, raffinement. Ce projet portant sur la physiologie cérébrale, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Pour cette demande (n total=9 animaux), nous avons estimé une utilisation d'animaux à hauteur de 3 par dose d'irradiation testées, avec 3 doses testées. Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque expérience, à la littérature, à la précédente expérimentation (2016102410037), aux expériences réalisées ces 15 dernières années qui nous a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Le suivi par IRM vasculaire ainsi que

par mesure comportementale nous permet d'évaluer sur un large spectre de mesures l'effet de l'irradiation à différentes doses, cela est en accord avec le raffinement de la règle des 3R. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

10714 L'objectif de notre équipe de recherche est de caractériser les mécanismes physiopathologiques impliqués dans une maladie rare afin d'en améliorer son diagnostic moléculaire et sa prise en charge. Cette pathologie, nommée holoprosencéphalie, résulte d'un défaut de formation du cerveau lors du développement embryonnaire. Aux anomalies du cerveau sont associées des anomalies du développement crânio-faciale. Nous souhaitons étudier l'impact de l'anomalie cérébrale sur le développement des os de la boîte crânienne. Ce travail permettra de mieux diagnostiquer les patients souffrant d'une microforme d'HPE pour une meilleure prise en charge.

La procédure qui justifie cette demande d'autorisation est l'utilisation d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) pour observer les anomalies du cerveau et de la boîte crânienne de ces animaux. Les techniques d'IRM sont des outils de choix pour réaliser de l'imagerie 3D à haute résolution spatiale sur des structures cérébrales.

L'observation d'animaux *in vivo* nécessite la mise en place d'un protocole d'anesthésie pour assurer l'immobilité de l'animal dans le spectromètre-imageur. Nous faisons également une demande d'autorisation pour administrer un agent de contraste (le chlorure de manganèse) afin d'identifier les structures cérébrales d'intérêts.

- La mise en place de cette pathologie implique des processus de développement embryonnaire complexes qui ne peuvent pas être reproduit à l'échelle de la cellule. Le modèle murin est le meilleur modèle pour étudier la physiopathologie de l'Holoprosencéphalie car le développement précoce du cerveau est très conservé entre les mammifères. Dans notre laboratoire, nous avons obtenu des animaux transgéniques qui développent une forme mineure de cette pathologie (Remplacer).

- Cette forme de la pathologie n'a pas d'impact sur la qualité de vie des animaux adultes. Par ailleurs nos approches méthodologiques seront non dommageables pour l'animal et sans douleur ; n'impliquant qu'une injection intrapéritonéale et une anesthésie gazeuse. Les analyses seront réalisées sur les animaux selon les règles d'éthique en vigueur. Les animaux seront manipulés par des chercheurs qualifiés et une surveillance journalière sera effectuée par du personnel habilité (raffiner).

- Une première étude a été précédemment réalisée sur des embryons de souris. Ce qui nous a permis d'obtenir des résultats préliminaires chez ce modèle et montrer que l'anomalie observée est 100% pénétrante. Un tel taux de pénétrance implique que seulement quelques animaux adultes seront nécessaires pour obtenir des résultats fiables (Réduire).

Le nombre de souris adultes utilisé sera de 50

10715 À l'heure actuelle, plus de 15% des couples rencontrent des problèmes d'infertilité et font appel à la Médecine pour tenter d'y remédier. C'est ainsi que, depuis au moins deux décennies, le nombre de consultations et de prises en charge dans les centres d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) n'a cessé d'augmenter. Dans tous les cas, que l'homme ou la femme soit atteint-e, c'est cette dernière qui devra intégrer un protocole clinique au cours duquel des ovocytes lui seront prélevés puis fécondés *in vitro* avant d'être transférés dans son utérus. Toutefois, même si l'évolution technologique permet désormais de s'assurer de la qualité d'un ovocyte fécondé, le taux d'échec de transfert reste fort, avoisinant en moyenne 60% et est le plus souvent imputable à un défaut d'implantation de l'embryon pour lequel la Médecine ne dispose d'aucun moyen fiable de pronostic ou de diagnostic.

Au laboratoire, nous avons découvert une nouvelle protéine produite très majoritairement par l'utérus, et principalement pendant la courte période où l'œuf fécondé peut s'y implanter (période dénommée "fenêtre d'implantation" ou « de réceptivité utérine »). Cette molécule se présente comme un nouveau biomarqueur de l'état fonctionnel de l'utérus et nous avons récemment montré qu'il passait dans le sang où il serait alors possible de le doser. La mise au point d'une méthode de

dosage à visée diagnostique, fait actuellement l'objet d'un programme de R&D protégé par brevet et n'impliquant pas le recours au modèle animal.

Il est toutefois indispensable de comprendre et de définir l'ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires qui régissent la production de ce biomarqueur par l'utérus dans des conditions normales mais aussi pathologiques. L'ensemble de ces connaissances sera en effet d'un apport considérable à la Médecine, tant pour l'utilisation optimale de son dosage, que pour la mise au point de méthodes thérapeutiques ciblant l'infertilité. Le présent projet d'étude porte sur la régulation hormonale de ce biomarqueur et vise 1) à déterminer quelle(s) hormone(s) contrôlent sa production et 2) à définir les mécanismes moléculaires fins de ce contrôle. Dans ce contexte, réaliser des études chez l'animal de laboratoire est incontournable, mais nous ferons en sorte que ce projet soit conforme aux exigences de la règle des 3R :

- Remplacement : pour être transposable en clinique, cette étude doit être réalisée dans un contexte physiologique qui intègre des régulations hormonales complexes et dynamiques et dans lequel il est possible d'analyser les fluctuations sanguines en parallèle avec différents états de l'utérus (pré-pubère, au cours du cycle, gravide, etc.). À ce titre, l'utilisation de modèles mammifères (souris) est incontournable.

- Raffinement : nos approches méthodologiques seront non dommageables pour l'animal et sans douleur car n'impliquant que des injections sous-cutanées d'hormones naturelles. Par ailleurs, le confort de stabulation et la bonne santé des animaux étant les gages de leur aptitude à se reproduire et donc de la réussite de cette étude, nous veillerons à ce que ces conditions soient toujours optimales et constantes. Enfin, les analyses seront réalisées sur les animaux selon les règles d'éthique en vigueur, accompagnées d'une surveillance journalière par du personnel qualifié.

- Réduction : afin de diminuer au mieux le nombre d'animaux étudiés, une étude préliminaire ne comportant que 6 animaux sera effectuée. Elle permettra de montrer la pertinence et la faisabilité du projet global. Si ce dernier est mis en œuvre, les prélèvements effectués sur les 6 premiers animaux seront inclus dans l'étude globale des deux premières hormones (17- β œstradiol et progestérone) les plus susceptibles de contrôler l'expression de ce nouveau biomarqueur et qui nécessitera 48 souris au total. Dans le cas où aucune des deux hormones précitées ne montre d'effet sur la production du biomarqueur, nous testerons l'effet de l'hormone lutéinisante (LH) et de l'hormone folliculostimulante (FSH) sur cette même production, ajoutant 42 animaux à l'étude, soit un total de 90 animaux au maximum.

10716 L'objectif de ce travail est de réparer / régénérer un tissu osseux après lésion en utilisant un biomatériau poreux hybride organique/inorganique implanté en remplacement d'une partie de l'os pariétal de la boîte crânienne chez la souris. L'étude est réalisée dans un modèle d'ingénierie tissulaire de la sphère cranio-faciale. Après anesthésie par mélange kétamine/xylazine, les craniotomies standardisées sont réalisées à l'aide d'un trépan. Les défauts osseux ainsi réalisés sont ensuite comblés par différents biomatériaux. Ce modèle est celui du défaut osseux dit critique car ne pouvant se réparer / consolider spontanément seul. Les animaux reçoivent une médication postopératoire à base de buprénorphine. Après 12 semaines, les pièces crâniennes sont prélevées pour examen radiographique par scanner à rayons X et analyse histologique.

Pour respecter le principe des 3R, des études préliminaires *in vitro* ont été réalisées afin de définir les biomatériaux présentant les meilleures caractéristiques a priori afin de réduire le nombre de groupes. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum, 50 souris seront nécessaires en fonction des effets observés, ce qui permettra d'envisager une étude adéquate sur le plan statistique. Pour éviter toute douleur chez la souris, la chirurgie et toutes les séances d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale. Un suivi attentif des signes d'infection et de douleurs sera effectué. Une prise en charge par des antalgiques et des antibiotiques est prévue si nécessaire.

Aujourd'hui, la principale limitation d'un substitut osseux est le manque d'induction d'une vascularisation suffisante à l'invasion et la survie des différents types cellulaires du remodelage osseux, spécialement pour une implantation dans des zones peu vascularisées comme au niveau

de la sphère cranio-faciale. Ces processus complexes ne peuvent être mimés en utilisant des boîtes de cultures ou par informatique. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

L'objectif final de cette étude est la validation à l'échelle d'un organisme du fort potentiel que représentent ces nouveaux biomatériaux pour permettre dès que possible leur utilisation chez l'homme en médecine régénératrice notamment pour les personnes atteintes d'une perte osseuse traumatique ou pathologique.

10717 La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène humain qui infecte la peau et provoque des lésions cutanées importantes. Etant donné sa résistance à des antibiotiques multiples, notre projet de recherche se focalise sur des moyens thérapeutiques alternatifs ciblant la lectine LecB. La lectine est une molécule de virulence bactérienne qui se trouve à la surface de la bactérie et qui semble lui faciliter l'infection cellulaire. Une réponse immune (vaccination) pourrait apporter une nouvelle approche thérapeutique contre ce pathogène. Dans ce cadre, nous cherchons à savoir si le système immunitaire peut générer une réponse immunitaire contre cette lectine. Pour ce faire nous utiliserons un modèle animal (souris), car actuellement il n'existe pas de méthodologie qui reproduit la complexité cellulaire nécessaire afin d'induire et d'étudier la réponse immunitaire. Le nombre total des souris pour ce projet est de 240 animaux.

Dans le souci de raffinement, les animaux sont hébergés en groupe dans un environnement enrichi comprenant jeux de bois et carton et reçoivent de l'anesthésie et des soins appropriés. Nous évitons des interventions de longue durée et appliquons des points limites établis préalablement afin d'évaluer, d'éviter et de soulager la souffrance. Ainsi, les immunisations sont effectuées sur des souris sous anesthésie générale et par un personnel compétent. Nous utiliserons les connaissances rapportées dans la littérature et acquies par les laboratoires, notamment sur les techniques permettant de localiser la lectine, d'identifier les cellules qui la fixent et d'analyser la réponse immunitaire. Ces connaissances servent également à réduire le nombre de souris. L'analyse de nos données sera effectuée par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni.

10718 Il est aujourd'hui établi que les vaisseaux dans le cerveau et la moelle épinière (Système Nerveux Central (SNC)) jouent un rôle majeur dans les maladies neuro-inflammatoires et neurodégénératives. Cependant, la question se pose de savoir si les vaisseaux du SNC agissent de manière isolée ou bien en interaction avec les astrocytes qui sont les cellules qui protègent les neurones. Mon hypothèse est que la physiopathologie des maladies neuro-inflammatoires et neurodégénératives repose en grande partie sur le déséquilibre des interactions entre les vaisseaux et les astrocytes dans le SNC. Mes objectifs sont (1) d'identifier les acteurs principaux impliqués dans ce déséquilibre et (2) d'évaluer dans quelle mesure cibler ces acteurs limitent le développement, la progression et la sévérité des maladies.

Pour mener nos études, nous utilisons deux modèles murins de neuro-inflammation, respectivement l'injection dans le cerveau d'un facteur pro-inflammatoire et un modèle reproduisant les symptômes de la Sclérose en Plaques (encéphalomyélite). De plus nous utilisons une technique d'imagerie par microscopie deux photons chez l'animal.

Les bénéfices attendus de notre projet de recherche sont l'identification de mécanismes impliqués dans la déstabilisation des interactions « vaisseaux-astrocytes » permettant le développement de traitements alternatifs de l'inflammation et de la dégénérescence dans de nombreuses maladies (Diabète, Démence Vasculaire, Maladie d'Alzheimer et de Parkinson, Sclérose en Plaques). Pour réaliser ce projet à fort impact préclinique, les modèles animaux sont indispensables. Le nombre total d'animaux utilisés pour ce projet est de 920.

En accord avec le principe des 3Rs (Réduction, Raffinement, Remplacement), nous avons réfléchi à notre projet de recherche de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés ainsi que la souffrance imposée par la procédure détaillée dans le document.

Réduction : afin de ne pas utiliser plus que le nombre minimal d'animaux nécessaires pour que nos résultats soient validés par nos pairs, nous avons déterminé, selon les études précédentes, la taille d'échantillon requis.

Raffinement : les animaux seront hébergés de façon adaptée à leurs besoins et recevront une surveillance quotidienne : les animaux seront mis en cage par l'animalier qui effectuera un premier contrôle de leur état de santé. Les animaux bénéficieront d'une période d'acclimatation dans des cages collectives et d'un enrichissement constitué d'un igloo et d'un nid végétal. L'injection dans le cerveau ainsi que l'induction de l'encéphalomyélite seront effectuées sous anesthésie générale ; plusieurs raffinements sont prévus pour veiller au confort de l'animal (utilisation d'une crème oculaire, maintien d'une température physiologique, utilisation d'un antidouleur avant et après la chirurgie). Le suivi des symptômes après l'induction de l'encéphalomyélite fera l'objet d'un scoring quotidien des animaux entre J7 et J28 suivant l'induction afin d'évaluer l'état de santé et le bien-être des animaux. Ces scoring seront consignés dans un cahier d'expérience prévu à cet effet. L'atteinte d'un score égal à 4,5 deux jours consécutifs conduira à l'euthanasie immédiate de l'animal concerné.

Remplacement : le projet porte sur l'étude des vaisseaux et des astrocytes du SNC dans la Sclérose en Plaques, un système cellulaire complexe impossible à reproduire dans son intégralité *in vitro*. Néanmoins, pour veiller aux obligations de remplacement, nous avons conçu une stratégie expérimentale qui comprend la mise au point de nos approches thérapeutiques par des tests *in vitro* (cocultures cellules endothéliales-astrocytes-lymphocytes, micro-fluidique).

10719 Contexte scientifique :

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de décès dans le monde. Malgré les progrès récents et la mise en place de stratégies thérapeutiques visant à diminuer le mauvais cholestérol dans le sang, plus de 17 millions de patients décèdent de pathologies cardiovasculaires chaque année. Récemment, l'inflammation est apparue comme une composante centrale contribuant au développement des maladies cardiovasculaires mais les mécanismes qui régissent cette inflammation restent inconnus. Certaines publications ont pu mettre en évidence que des altérations des voies métaboliques du glucose pouvaient être impliquées dans ces pathologies. Ce projet vise à identifier et valider de nouvelles voies métaboliques, en particulier le rôle du transporteur du glucose (Glut1), qui contribuent à l'inflammation liée aux maladies cardiovasculaires.

Problématique :

Le dérèglement des cellules immunitaires est souvent associé à la progression des maladies cardiovasculaires. Les monocytes sont capables de détecter et utiliser des acides gras pour leurs demandes métaboliques. Ce taux d'acides gras circulants subit le même rythme circadien que les monocytes. Cela suggère une interaction entre l'utilisation des substrats glucidiques et lipidiques par les monocytes dans le contrôle de leur activation. Ainsi, nous allons nous intéresser au rôle de la lipolyse du tissu adipeux sur la dynamique des monocytes et leur activation en présence ou absence des récepteurs Glut1 au niveau des monocytes et ceci d'une manière circadienne.

Hypothèse de travail :

Notre projet de recherche vise à étudier la dynamique des monocytes et macrophages au cours des maladies cardiovasculaires. Pour cela nous allons utiliser des modèles murins appropriés afin de déterminer les mécanismes qui régulent l'activité de ces cellules. Nous analyserons cela dans des modèles précliniques de pathologies cardiovasculaires bien définis et validés par la communauté scientifique.

Justification du modèle et raffinement :

Les maladies cardiovasculaires sont des pathologies complexes dans lesquelles de multiples voies métaboliques et physiologiques interviennent. Une approche de culture cellulaire n'est pas adaptée afin de répondre aux demandes de cette problématique. Des modèles murins athérogéniques ont été développés et validés par la communauté scientifique comme outils d'études précliniques. Pour répondre à la règle des « 3R » nous allons utiliser des tests statistiques nous permettant de réduire le nombre d'animaux afin de pouvoir tout de même répondre clairement à notre question scientifique. Les procédures proposées sont basées à la fois sur une justification scientifique et tiennent compte du bien-être animal. Comme décrit précédemment, aucune méthode alternative *in*

vitro ou *in silico* n'est adapté afin de remplacer le modèle murin. La mise en place de points limites permet l'amélioration du bien-être animal afin de supprimer la détresse ou l'angoisse des animaux. En terme de raffinement, pour chaque procédure, nous avons pris en compte la gestion de la souffrance, l'angoisse et la douleur pour nos modèles murins. Notamment au cours de l'analyse par calorimétrie, de la litière sera déposée jusqu'au niveau de la grille de sol de la cage métabolique afin d'éviter aux souris une station directement sur le métal. De plus, une anesthésie par inhalation au vetflurane jusqu'à endormissement de l'animal sera réalisée afin de diminuer la souffrance pour la procédure "Recrutement monocyttaire".

Perspectives :

Cette étude pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de traitement visant à moduler ces différentes voies métaboliques dans les maladies cardiométaboliques. Afin de pouvoir conclure sur l'importance de ces voies métaboliques nous avons calculé (test de significativité statistique) que 1160 souris devraient être utilisées et réparties sur une période de 5 ans. L'ensemble des procédures proposées dans ce projet sont connues comme non remplaçables par des procédures ne faisant pas intervenir directement l'animal.

10720 La barrière hémato-encéphalique protège le cerveau du reste de l'organisme. Elle contrôle les échanges entre le sang et le compartiment central et permet les apports d'oxygène et de nutriments nécessaires à la survie des cellules neuronales. Cette barrière est donc un élément essentiel pour le bon fonctionnement physiologique du cerveau. Il a été montré que cette étanchéité est dégradée chez des patients atteints de maladies neuro dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Nous voulons dans ce projet fondamental comprendre comment ses structures jointives sont maintenues et analyser si on les rompt, l'impact sur la dégradation des neurones. Ce projet sera réalisé en utilisant des modèles génétiques murins qui reproduisent certaines des lésions neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer, ainsi que les signes cliniques associés à cette maladie, comme les déficits d'apprentissage et de mémoire.

Pour réduire le nombre des animaux aucune expérience déjà publiée n'est reproduite et lorsque cela est possible les études conceptuelles sont réalisées *in vitro* sur des cellules en culture avant d'être testé *in vivo*. Cependant la physiologie des vaisseaux est complexe, met en jeu des interactions multiples entre les composants de la paroi vasculaire et le sang qui ne peuvent pas être reproduites *in vitro* de façon satisfaisante. Suite à notre expérience, 12 animaux par groupe sont nécessaires pour obtenir des résultats exploitables statistiquement. Pour réduire le nombre des animaux, les mêmes animaux seront inclus pour une analyse de comportement puis une analyse histologique. La souffrance des animaux est réduite par l'usage d'anesthésiques et d'antalgiques adaptés lors du suivi des cohortes. Les animaux sont surveillés par la visite quotidienne du zootechnicien. En cas de problème de santé des animaux, l'expérimentateur est immédiatement alerté. Il prendra la décision de l'euthanasie en fonction d'une grille prédéfinie. Ce projet de recherche sur 5 ans impliquera 96 souris.

10721 Objectifs du projet

La perte des photorécepteurs (PR) sont des causes fréquentes de déficience visuelle. Malgré de nombreux essais cliniques, il existe encore un manque complet de traitements pour la grande majorité des cas. Le succès récent de la thérapie génique chez les patients atteints de l'Amaurose Congénitale de Leber (ACL) causée par des mutations RPE65 a montré des résultats impressionnants et un intérêt réel pour l'élargir à d'autres maladies. Notre projet consiste à développer une thérapie génique pour traiter les formes dominantes de dystrophies rétiniennes (DR). Nous travaillerons sur les rétinopathies associées à CRX conduisant chez l'Homme à des rétinites pigmentaires (RP), des dystrophies des cônes ou à l'ACL. L'objectif est de surexprimer une version sauvage de CRX grâce à des vecteurs AAV pour compenser les effets délétères de la forme mutée.

Avantages et dommages escomptés

L'existence de lignées de souris atteintes spontanément ou non de dégénérescence rétinienne en fait un excellent organisme modèle pour notre projet.

Une part de nos expériences n'est pas soumise au dépôt de demande d'autorisation de projet car réalisées sur animaux euthanasiés sans manipulation préalable. Les phénotypes des animaux sont restreints à la rétine, un organe non vital. De plus, la vue, chez les souris est un sens peu utilisé et les animaux aveugles arrivent à compenser à l'aide d'autres sens comme l'ouïe, l'odorat, les vibrisses ou le toucher. Les animaux, bien qu'aveugles, ne présenteront donc pas de phénotypes dommageables à leurs conditions de vies. Le caractère non dommageable des lignées murines existantes utilisées pour ce projet a déjà été validé par le comité d'éthique lors d'un précédent dépôt (Annexe I). Les lignées créées devront être évaluées afin de valider le phénotype non dommageable attendu. Les différentes procédures qui seront effectuées ont un niveau de sévérité de classe légère à sévère mais sont couramment utilisées en recherche ophtalmologique.

Nombre et types d'animaux à utiliser sur 5 ans.

Nous prévoyons d'utiliser 1562 animaux pendant la durée de 5 ans du projet (432 souris sauvages, 438 mutants spontanés et 692 souris génétiquement modifiées) (Annexe II et III).

Conformité avec les exigences 3R.

i) Réduction : le laboratoire possède un Micron IV (Phoenix Research Laboratory) qui permet d'enregistrer des électrorétinogrammes (ERG), faire des fonds d'œil et des angiographies sur des animaux anesthésiés. Ceci permettra de suivre l'efficacité de la thérapie au cours du temps sans avoir à sacrifier les animaux et donc limiter leur nombre. Le nombre d'animaux à utiliser sera toujours optimisé et en adéquation avec la validation statistique des résultats obtenus.

ii) Remplacement : afin d'éviter douleur et inconfort, nous souhaitons aussi souvent que possible remplacer les manipulations *in vivo* par des expériences de culture d'explants de rétines provenant d'animaux euthanasiés. Ce modèle pourrait permettre de valider certaines étapes nécessaires au développement de la thérapie avant passage chez l'animal.

iii) Raffinement : les animaux sont élevés dans un environnement contrôlé et enrichi. Nous aurons recours aux procédures anesthésiques appropriées. Les points limites de nos expériences sont déterminés en fonction de la santé générale des animaux ayant subi des manipulations de leur vivant. Les doses d'AAV injectés seront réajustées suite à la survenue de manifestations extérieures de mal-être. Cependant leur innocuité a été largement rapportée dans la littérature.

10722 Les pathologies qui induisent les dommages temporaires ou permanents de l'oreille interne causent des déficits fonctionnels importants chez le patient. Les altérations de la fonction auditive (surdité) et de perception auditive en relation avec le système nerveux central (acouphènes), lorsqu'elles sont persistantes, deviennent handicapantes avec pour conséquences des problèmes de communication, d'isolement, de dépression et des problèmes cognitifs. De même les crises aiguës de vertige temporaires ou permanentes sont difficilement supportables et empêchent tout fonctionnement autonome quotidien. Actuellement, aucun traitement ciblé et efficace n'est disponible pour les patients souffrant de telles pathologies. Nous travaillons à l'identification et au développement de traitements ciblés pour satisfaire ce besoin médical en santé publique. Ce projet répond aux demandes des autorités réglementaires liées aux identifications et développement de candidats médicaments. Après avoir été identifiés et testés dans des études *in vitro*, il est nécessaire que ces composés démontrent efficacité et sécurité *in vivo* chez l'animal avant passage chez l'homme. La capacité des candidats-médicaments à atteindre les cibles dans l'oreille interne et traiter la surdité, le vertige ou les acouphènes, ne peut être évaluée que chez l'animal avec une oreille interne et système nerveux central complet, capable de reproduire le fonctionnement et les symptômes observés chez le patient. De plus, pour soutenir le développement d'un candidat-médicament, il est nécessaire de bien établir la posologie du produit et la fenêtre thérapeutique avant d'entrer en phase clinique. Ce projet inclut donc trois procédures pour trois modes d'induction de pathologies et symptômes chez le rat que sont les atteintes toxiques locales de l'oreille interne, les atteintes ototoxiques systémiques et les atteintes acoustiques par l'exposition au bruit. Il représente un raffinement des méthodes et modèles proposés dans les projets précédents

permettant d'aborder plus de maladies et symptômes, ainsi que la possibilité de documenter l'interaction entre les atteintes aiguës, leurs traitements et le vieillissement. Chacune de ces procédures permet de reproduire la situation clinique chez le patient et tester l'efficacité des candidats-médicaments, ainsi que d'étudier leur pharmacocinétique. Il couvre l'utilisation d'un maximum de 20580 rats sur 5 ans. Les études réalisées au sein du centre de recherche, par du personnel formé et compétent, ayant déjà contribué aux lancements de deux programmes de développement clinique, sont encadrées par des recommandations internes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (éthique, hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal (utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques). Une analyse statistique optimise les méthodes expérimentales employées, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire. Tous ces éléments assurent l'application maximale du principe des 3R.

10723 L'érythropoïèse est le processus de formation de globules rouges, cellules qui permettent le transport de l'oxygène. Afin de maintenir un taux de globules rouges adapté aux différentes conditions physiopathologiques, il existe une fine régulation de l'érythropoïèse au niveau cellulaire et moléculaire.

Dans le passé nous avons montré que les protéines de choc thermique (HSP) sont impliquées dans l'érythropoïèse. Nos résultats préliminaires chez le poisson-zèbre montrent que la protéine HSF1 qui contrôle l'expression des HSPs est également nécessaire à l'érythropoïèse, et de façon partiellement indépendante des HSPs. Notre projet consiste à confirmer ce rôle dans un modèle murin *in vivo*, car plus proche de l'érythropoïèse humaine.

Nous utiliserons donc un modèle de souris déficientes pour HSF1 que nous comparerons avec des souris contrôles exprimant HSF1. Cette lignée murine existe mais nous devons réaliser des croisements pour son maintien et son développement afin d'obtenir le nombre d'animaux nécessaire à notre étude. Les souris sont parfaitement viables en conditions d'hébergement appropriées, et ne présentent aucune anomalie susceptible de les faire souffrir, leur phénotype n'est pas dommageable.

Cependant, les femelles homozygotes (*Hsf1*^{-/-}) sont infertiles car leurs embryons sont incapables de se développer au-delà d'un stade très précoce. De plus, le nombre d'animaux produit sera assez élevé en raison d'un faible ratio des animaux homozygotes, il y a en effet une forte mortalité prénatale chez les souris homozygotes. De plus, nous devons conserver les souris sur un fond génétique mixte.

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum en fonction des résultats des génotypages, et de nos besoins. Nous estimons à 200 (40 souris pour la phase expérimentale) le nombre total d'animaux qui seront utilisés dans ce projet. Ce nombre d'animaux correspond au nombre minimal permettant d'obtenir des résultats significatifs avec le test statistique utilisé.

Les souris seront hébergées en groupe pour favoriser les contacts sociaux, avec un enrichissement du milieu approprié. Un contenant sera placé dans chaque cage leur permettant de se cacher et de développer leur répertoire comportemental (exploration, enfouissement...).

Lorsque les souris seront âgées de 10 semaines, nous analyserons leur formule sanguine par prélèvement d'une petite goutte de sang au niveau de la queue. Des mesures de raffinement seront prises pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux dans les expériences suivantes. Nous induirons une anémie transitoire par injection de phénylhydrazine sous anesthésie générale des animaux afin de limiter leur stress. Après chaque administration nous observerons la souris à son réveil pour vérifier la reprise de sa mobilité et de son activité dans la cage. Afin de limiter les effets de l'anémie sur les animaux, ils bénéficieront pendant une semaine d'une alimentation enrichie (consistant en aliments gélifiés et croquettes directement disponibles sur la litière).

La formule sanguine sera analysée tous les 2 jours sur une période de 8 jours. Au cours du développement de l'anémie transitoire et dès l'administration de phénylhydrazine, les animaux seront surveillés au jour le jour par mesure du poids et observation de leur état général (aspect du

poil) et de leur comportement (mobilité). Les animaux devraient récupérer une formule sanguine normale 8 jours après l'injection ainsi qu'une activité normale. A l'issue de l'expérience, les animaux seront euthanasiés après anesthésie générale et la moelle osseuse sera extraite des fémurs et des tibias pour déterminer sa capacité à réaliser l'érythropoïèse.

Ce projet nous permettra de confirmer *in vivo* le rôle de la protéine HSF1 dans l'érythropoïèse murine, modèle plus proche de l'homme que le poisson-zèbre.

10724 D'origine infectieuse ou liées à la consommation excessive d'alcool ou de régime alimentaire riche en graisses, les maladies du foie deviennent souvent chroniques avec un risque de développement de cancer du foie grave et préoccupant en terme de santé publique. Afin d'améliorer la connaissance de ces maladies, notre équipe se consacre à la caractérisation des facteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement et la régulation de ces maladies du foie que l'on appelle hépatites. Des collaborateurs ont identifié l'importance d'un facteur de régulation de la réponse inflammatoire, la céramide synthase S5 (CerS5), dans l'hépatite virale chez l'homme. Cette équipe a généré des souris déficientes pour le gène codant ce facteur CerS5 et notre projet collaboratif est soumettre ces souris à une hépatite virale murine pour comprendre le rôle de ce facteur. Les animaux infectés seront étudiés pendant 5 jours. Les organes prélevés (foie et cerveau) seront analysés par différentes méthodes pour quantifier l'atteinte hépatique et cérébrale et l'avancée des processus de défense immunitaire du foie. Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué au nombre de 168, nous avons pensé ce protocole en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner » :

- Nous avons réduit le nombre de souris à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats ; et nous avons envisagé plusieurs mesures sur les échantillons prélevés au niveau des 2 organes touchés par la maladie pour ainsi récolter un maximum d'informations qui viendront compléter celles déjà obtenues.

- Nous avons raffiné le protocole en prenant soin d'ajouter dans la cage des souris infectées un bloc de gélose humide pour leur permettre de se restaurer alors qu'elles auront une fièvre élevée du fait de l'infection virale. Les souris seront suivies tous les jours, 2 fois par jour, et seront toutes euthanasiés avant d'arriver au stade ultime de l'infection. Des points limites ont été définis pour éviter tout inconfort ou souffrance.

- Il faut noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer de telles études qui englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique, et que seule l'expérimentation animale permet un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces et permet d'étudier la réponse physiologique d'un individu déficient pour une molécule d'intérêt pour évaluer son rôle.

Ce travail permettra de préciser le rôle du facteur CerS5 dans la mise en place de la maladie « hépatite virale » chez la souris. A terme, les données de ce travail pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies de traitement des maladies du foie.

10725 Les encéphalites chez l'homme présentent une incidence de 2 à 12 pour 100000 suivant l'âge des patients considérés et leur localisation géographique. Une fraction de ces encéphalites correspond à des cas de rage. Ils sont très souvent la conséquence d'une morsure de chien enragé et concernent principalement des enfants. L'OMS estime l'impact de la rage sur l'homme à au moins 50000 décès par an. Le laboratoire utilise des souris adultes ou âgées de 48 heures (génétiquement modifiées ou non selon les applications) pour l'isolement et le diagnostic des virus agents d'encéphalite et en particulier des lyssavirus (les agents responsables de la rage), pour des expériences concernant l'évaluation et la mise au point de nouvelles approches thérapeutique et vaccinale de la rage chez l'homme et enfin pour la compréhension des mécanismes liés à la virulence et la pathogénie des lyssavirus en lien avec leur capacité à franchir la barrière d'espèce et à infecter l'homme.

Ces expérimentations suivent la règle des 3R :

Remplacement : ces expériences viennent compléter des expérimentations effectuées sur culture cellulaire et ne sont utilisées que lorsqu'elles représentent une étape incontournable pour l'avancement de la connaissance scientifique et non actuellement remplaçable par des tests *in vitro*.

Raffinement : Des mesures sont prises pour réduire la douleur, la souffrance (anesthésie, analgésie) et l'angoisse (plusieurs souris par cage, mise en place d'igloo et d'éléments d'enrichissement du milieu). Enfin, des points limites sont clairement définis et permettent d'éliminer toute souffrance inutile.

Réduction : l'analyse des résultats utilise des tests statistiques permettant de comparer dans les règles de l'art les données qualitatives ou quantitatives obtenues et limitant le nombre d'animaux au strict nécessaire. Environ 750 animaux seront utilisés selon trois procédures décrites ci-dessous.

Isolement, et diagnostic des virus responsables d'encéphalite et notamment des lyssavirus, agents de la rage chez l'homme

L'isolement des virus fait de moins en moins appel à l'animal. Néanmoins il est parfois incontournable de procéder à l'utilisation de souris adultes ou mieux âgées de 48 heures lorsque des systèmes cellulaires alternatifs et susceptibles à l'infection n'existent pas ou seraient trop lourds à mettre en place dans un diagnostic de routine de laboratoire. La voie d'infection (injection par voie intramusculaire, par voie intracérébrale ou par voie intrapéritonéale) est choisie en fonction de la pertinence physiopathologique du modèle et des données existantes dans la littérature.

Tests d'efficacité vaccinale et d'activité antivirale

D'une façon générale, ces tests sont réalisés pour tester l'efficacité immunogène ou l'efficacité antivirale d'une préparation. Ils commencent soit par une phase d'immunisation avec la préparation (avec ou sans adjuvant) ou soit par l'injection du composé chimique qui comporte une ou plusieurs injections de la préparation par différentes voies. Le test d'efficacité réalisé *in vivo* (injection par voie intramusculaire ou par voie intracérébrale de l'agent infectieux contre lequel la préparation est supposée protéger) fait suite et complète les résultats obtenus *in vitro*.

Evaluation de la pathogénie d'agents infectieux responsables d'encéphalite et de lyssavirus en particulier

Le contrôle de la rage dépend entre autres de la compréhension des mécanismes impliqués dans l'adaptation des lyssavirus à de nouvelles niches écologiques. Le laboratoire dispose d'un catalogue d'isolats présentant naturellement des mutations et du savoir-faire technique nécessaire à l'introduction de ces mutations dans d'autres isolats. L'expérimentation sur animaux permettra de relier la diversité génétique du virus avec les caractéristiques phénotypiques (pouvoir pathogène, diffusion dans l'organisme) de l'infection chez l'animal de laboratoire. La voie d'infection (injection par voie intramusculaire, intracérébrale ou intrapéritonéale) est choisie en fonction de la pertinence physiopathologique du modèle et des données existantes dans la littérature.

10726 Notre projet est centré sur l'étude des effets neurotrophiques et neuroprotecteurs des neuropeptides et autres molécules d'intérêt. Pour nos études, nous utilisons régulièrement les cultures primaires de cellules en grain, pour tester l'effet des peptides sur la survie, motilité et différenciation des neurones. Pour réaliser ces cultures, nous avons besoin de produire en moyenne une portée de rats âgés de 8 jours par semaine. De ce fait, nous sollicitons à travers cette demande l'autorisation de mettre en place un élevage de reproducteurs utilisés pour générer des rats qui sont euthanasiés à l'âge de 8 jours. Sur la durée totale du projet, nous allons utiliser environ 240 femelles et 60 mâles. Nous générerons environ 3500 petits. En ce qui concerne la règle des 3R, les animaux générés sont utilisés pour réaliser des cultures primaires. Cette technique permet de tester un grand nombre de molécules neuroprotectrices ou neurotoxiques, comparé à des études *in vivo*, ce qui contribue à réduire le nombre d'animaux utilisés. A titre d'exemple, nous pouvons avec un cervelet remplir 24 puits d'une plaque de culture et ainsi tester 24 conditions expérimentales. L'intérêt d'utiliser des rats réside dans le fait que leur cervelet est significativement plus gros que celui d'une souris, ce qui permet d'obtenir plus de cellules à partir d'un animal. Nous allons mutualiser les naissances lorsqu'il y en a trop de petits avec d'autres projets et garder les petits en excès pour générer des reproducteurs ultérieurs. L'élevage et la reproduction d'animaux n'induit

pas de stress ni de souffrance particulières. Les animaux sont élevés en groupes, en respectant les effectifs / surface de cage réglementaires et dans un environnement enrichi. Un suivi quotidien des animaux est pratiqué pour déceler toute détérioration de l'état de santé ou signe de souffrance (points limites).

10727 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire chronique des articulations. Les thérapies anti-TNF ou anti-IL-6R sont efficaces mais 1/3 patients sont toujours résistants et il est nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Le but de ce projet est d'étudier le potentiel thérapeutique de micro Acides Ribonucléiques (ARN)(mi-ARN) identifiés pour jouer un rôle clé dans la physiopathologie de la PR, seuls ou en association. Certains mi-ARN ont été étudiés en thérapeutique dans des modèles murins d'arthrite avec des effets anti-inflammatoires ou anti-résorptifs. Cependant, leurs effets étaient limités, et aucun travail n'a encore étudié leur rôle en association. Nous souhaitons donc utiliser une combinaison associant des mi-ARN (anti-inflammatoires ou anti-résorptifs) ou Antagomirs (inhibant des mi-ARN pro-inflammatoires ou pro-résorptifs) dans deux modèles murins d'arthrite, induits soit par le collagène (CIA) soit par l'antigène mBSA (AIA), pour étudier l'effet sur l'évolution de l'arthrite *in vivo*. Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement de ce projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro*, et une éventuelle application clinique. Elles sont incontournables avant une application clinique et ne peuvent être remplacées par des expérimentations *in vitro*. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative.

Dans une première partie, nous étudierons la concentration optimale pour l'injection des mi-ARN. Dans une seconde partie nous étudierons le potentiel thérapeutique de ces mi-ARN seuls ou en association dans 2 modèles de souris arthritiques soit un nombre total de 360 souris au maximum. Le bien-être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement (ajout de papier dans chaque cage pour leur permettre la conception d'un « nid »), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

10728 L'ischémie critique des membres inférieurs est un problème de santé publique majeur dans les pays industrialisés ; son risque est accru par la proportion croissante de patients diabétiques ou obèses. Cette pathologie a un pronostic très sombre puisque, à un an, seule la moitié des patients survivent sans amputation majeure. Plusieurs essais thérapeutiques visant à favoriser le développement de nouveaux vaisseaux pour revasculariser le membre malade ont été réalisés mais sans succès. L'objectif de notre projet est de mieux comprendre les processus pathologiques conduisant à l'ischémie critique dans le but de proposer de nouvelles thérapies. Plus précisément notre objectif est d'étudier l'impact de la dysfonction endothéliale dans un modèle murin d'ischémie critique du membre inférieur. De plus, nous testerons l'effet de deux nouvelles thérapies capable d'améliorer la fonction endothéliale induite par le diabète.

Ce programme de recherche sur 5 ans impliquera 632 souris. Pour réduire le nombre d'animaux, aucune expérience déjà publiée ne sera reproduite et lorsque cela sera possible, les études conceptuelles seront réalisées *in vitro* sur des cellules en culture avant d'être testée *in vivo*. Cependant l'ischémie critique du membre inférieur est une pathologie complexe mettant en jeu des interactions entre de nombreux types cellulaires locaux et circulants qui ne peuvent pas être reproduites *in vitro*. Suite à notre expérience concernant les modèles murins d'ischémie du membre inférieurs, 10 animaux par groupe sont nécessaires pour obtenir des résultats exploitables statistiquement. La souffrance des animaux est réduite par l'usage d'anesthésiques et d'antalgiques adaptés pour la réalisation des gestes douloureux et en post opératoire. Les animaux sont surveillés par la visite quotidienne du zootechnicien. En cas de problème de santé des animaux l'expérimentateur est immédiatement alerté. Les animaux sont hébergés en cage collective sur portoir ventilé, sur de la litière en cellulose enrichie ALPHA-dry + PLUS. L'eau et la nourriture sont fournies à volonté.

10729 Les études de pharmacocinétique (étude du devenir des médicaments dans l'organisme) et de biodistribution tissulaire (Répartition du médicament dans les différents organes) d'une molécule représente une étape essentielle dans le développement préclinique d'un médicament. Ces études *in vivo*, demandées par les conseils scientifiques des autorités de santé et les entreprises du médicament, ont pour but la compréhension et l'analyse du devenir du médicament dans l'organisme, l'évaluation d'une potentielle accumulation de ce dernier dans les organes et/ou tissus et ainsi qu'une meilleure appréhension d'éventuels effets indésirables. La pharmacocinétique est réalisée dans un premier temps chez un modèle animal sain, classiquement, la souris ou le rat.

Dans ce projet, nous nous intéressons à une nouvelle entité biologique à visée thérapeutique anti-cancéreuse. L'objectif de ce projet est d'évaluer la biodistribution et l'efficacité d'oligonucléotides thérapeutiques dans le cadre de différents traitements anti-cancéreux. En pratique, des souris anesthésiées recevront des doses non toxiques de la molécule anti-cancéreuse préalablement marquée par fluorescence ; un faible volume sanguin sera prélevé à intervalle régulier et analysé pour déterminer la pharmacocinétique.

Ce projet se base sur l'utilisation de souris naïves dans un premier temps, puis de modèles de tumeurs humaines xénogreffées sur des souris. Ces modèles, basés sur des hétéogreffes où le donneur et le receveur appartiennent à des espèces différentes, sont les seuls actuellement permettant de reconstituer sur animal la complexité des tumeurs humaines. Ainsi, les résultats obtenus permettront une réelle extrapolation de l'animal à l'homme.

Le projet dont la durée sera de 5 années inclura plusieurs études visant à caractériser différents candidats médicaments et d'optimiser la voie d'administration. Les études comprendront un total de 900 animaux. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études et surtout en fonction d'une analyse statistique dans le but d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible.

Tout au long de ce projet nous respecterons la règle des « 3 R ». Les protocoles combineront un ensemble de procédures permettant de faire un suivi et d'obtenir plusieurs informations chez la même souris. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leurs naissances à leurs morts. A ce titre, l'environnement des animaux sera enrichi. L'estimation de la souffrance est réalisée par le personnel de l'animalerie par un suivi visuel régulier et encadré par des points limites préalablement définis. Il n'existe actuellement pas d'alternatives validées à ces méthodes *in vivo*, nous ne pouvons donc pas remplacer les expériences *in vivo*.

10730 La douleur est un problème de santé publique majeur qui diminue considérablement la qualité de vie des patients. D'importants progrès ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes de la douleur, en revanche, peu concernant le développement de nouveaux analgésiques. Ainsi à l'heure actuelle les opiacés restent le moyen le plus efficace utilisé pour le traitement des douleurs moyennes à sévères. Malheureusement ils présentent de nombreux effets secondaires, parmi lesquels le développement d'une tolérance à leurs effets analgésiques, ce qui conduit inévitablement à une diminution de l'effet du traitement dans les douleurs chroniques telles que les douleurs inflammatoires ou neuropathiques. Ainsi, il est nécessaire de développer des analgésiques ayant moins d'effets secondaires.

Récemment, un nouveau neuropeptide endogène appelé spexine a été découvert. Ce peptide se lie à un récepteur dont l'implication dans la modulation de la douleur est déjà connue. En collaboration avec une équipe de chimistes, nous avons développé et breveté des dérivés de la spexine. Ces dérivés comportent une chaîne fluorocarbonée qui permet d'augmenter l'efficacité des molécules *in vitro* et leur stabilité dans le plasma. L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets analgésiques potentiels de la spexine et de ses dérivés fluorocarbonés chez la souris

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer : les molécules sélectionnées ont été caractérisées au préalable *in vitro* pour leur activité et leurs caractéristiques physicochimiques. Cependant, l'évaluation de leur effet sur le nociception n'est réalisable aujourd'hui que sur l'animal entier.

Réduire : Compte tenu de la variabilité dans les différentes expériences prévues, le nombre d'animaux est limité à 10 par groupe, ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques.

Raffiner : Les animaux sont hébergés dans une animalerie dont le fonctionnement est conçu pour maximiser leur confort et limiter leur souffrance. En particulier, les animaux sont hébergés en cohorte, dans un milieu enrichi, et observés quotidiennement par l'expérimentateur ou une personne compétente. Pour chaque procédure, des points limites adaptés ont été définis selon les directives éthiques indiquées par l'association internationale pour l'étude de la douleur. Dans la procédure nécessitant une chirurgie, celle-ci sera réalisée sous anesthésie générale et les animaux seront placés sur une plaque ou sous une lampe chauffante à 37°C jusqu'à leur réveil. Dans les procédures comprenant un modèle de douleur persistante, l'objectif étant d'étudier les effets anti-douleur de la spexine et de ses dérivés, une analgésie supplémentaire ne pourra être envisagée car elle remettrait en cause les conclusions de l'étude.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet : 1160 souris C57BL6N

10731 L'objectif du projet est de mettre en place une méthode d'évaluation de l'efficacité alimentaire individuelle chez la daurade et d'évaluer la variabilité génétique de cette efficacité alimentaire. L'objectif finalisé est de permettre une sélection sur l'efficacité alimentaire, qui n'est actuellement pas efficace du fait de l'absence de méthodes d'évaluation individuelle. Le bénéfice en serait une réduction de l'empreinte écologique des élevages (moins d'aliments consommés, moins de déchets produits). Le projet consistera en l'évaluation de l'efficacité alimentaire individuelle de 600 poissons d'un lot issu d'un programme de sélection et en la recherche de marqueurs génétiques (SNP) liés à cette capacité. Les animaux triés sur leur efficacité alimentaire individuelle seront évalués pour leur efficacité alimentaire en groupes de 50, pour évaluer la corrélation entre le critère individuel et le critère de groupe, qui est l'objectif appliqué.

Les effectifs ont été calculés à partir de données d'expérimentations précédentes sur le bar pour assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés (Réduction). La mise au point d'une méthode fiable d'évaluation de l'efficacité alimentaire, objet du présent projet, pourrait permettre une sélection plus efficace en disposant d'un critère plus lié au caractère d'intérêt que les critères indirects actuels. Pour réduire la souffrance et l'angoisse, les animaux sont manipulés uniquement sous anesthésie pour toutes les mesures individuelles, et sont disposés dans des aquariums leur permettant un contact visuel avec des congénères (Raffinement). Ce type d'expérimentation, où la variation observée et recherchée est liée à l'individu, ne peut se faire que sur animaux vivants. Il n'y a donc pas de remplacement.

10732 La myéline est une gaine essentielle à la fois pour l'isolation et la protection de chaque nerf du système nerveux central et périphérique. Tout défaut de myéline est associé à des pathologies dites neuropathies. Parmi les neuropathies périphériques les plus connues, on peut citer la maladie de Charcot-Marie-Tooth. A l'heure actuelle, les causes de ces défauts de myéline sont souvent inconnues et les traitements curatifs inexistantes. Afin de mieux comprendre les causes et pouvoir trouver de nouvelles solutions thérapeutiques, nous nous intéressons à une protéine identifiée chez la souris et/ou le poisson zèbre, appelée Adcy6. De manière intéressante, chez l'Homme, cette dernière est responsable dans un cas d'arthrogrypose congénitale héréditaire (raideur des articulations, plus communément appelée immobilité fœtale) associé à un défaut de myélinisation du système nerveux périphérique par les cellules de Schwann, cellules responsables de la myélinisation.

L'arthrogrypose est une maladie musculaire et articulaire avec une atteinte de l'intégrité des axones, suite à leur non myélinisation. Ce phénotype a été visualisé chez l'Homme. Les multiples tissus impactés et l'interaction entre différents types de cellules impliquées dans la mise en place du système nerveux périphérique est donc nécessaire pour faire cette étude et nécessite donc un organisme entier mammifère. Aucun système cellulaire *ex vivo* ne peut rendre compte de la physiologie du développement qui fait intervenir interactions cellulaires, molécules informatives (hormones, cytokines). De plus, le KO du gène Adcy6 dans une lignée de cellules spécifiques

(système Cre lox) indispensable pour nos études, n'est possible que chez le rongeur. L'avantage du modèle souris est que le contexte physiologique (hormones, nutriment, oxygénation) est respecté et permettra de suivre le développement de la pathologie humaine. Aucun autre modèle mammifère n'est aussi adapté à l'étude d'un tissu/organe en développement. L'objectif principal du projet est donc d'évaluer l'impact de la perte d'Acy6 chez la souris à la naissance et durant ses premières semaines de développement (jour 1, 4, 10, et 21). Nous allons donc analyser la formation du nerf sciatique comme nerf de référence par différentes techniques biologiques.

La règle des 3 R sera appliquée le long de ce programme de recherche. Les souris seront analysées *in vivo* / *in situ* / *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures (REPLACEMENT). Cette étude sera menée en parallèle d'un modèle de poisson zèbre et de culture de cellules (à partir des tissus prélevés) afin de remplacer et/ou réduire au maximum le nombre des souris, tester des produits pharmacologiques et orienter au mieux les expériences sur le nerf sciatique. De plus, le nombre d'animaux sera réduit à 6 par point expérimental, le minimum requis lors de nos travaux précédents de façon à mettre en évidence des différences statistiques avec un risque d'erreur moins que 5%. La méthodologie expérimentale est optimisée pour utiliser le strict nécessaire d'animaux, appartenant à la même lignée puisqu'un même animal servira à 2 analyses (REDUCTION). Un hébergement adapté, une surveillance quotidienne et la mise en place de points limites (euthanasie dès les 1^{er} signes de paralysie) contribueront au RAFFINEMENT. Le nombre total d'animaux qui seront utilisés dans ce projet est de 256 souris.

10733 L'État de Stress Post-Traumatique (ESPT ou PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder, APA 1994) est une pathologie psychiatrique à forte prévalence dans la population générale (8 – 12%) qui, en l'absence de prise en charge adaptée, peut se compliquer en formes handicapantes et comorbides (dépression, addictions, anxiété, etc.)

Le PTSD se caractérise par une constellation de symptômes qui surviennent après l'expérience d'un événement traumatique, cet événement peut toucher directement la personne et mettre en jeu sa vie (vécu de mort imminente), causer une blessure grave ou menacer l'intégrité physique, mais elle peut aussi avoir été témoins de la survenue de ces événements à d'autres personnes.

La symptomatologie du PTSD se définit alors par un syndrome de reviviscence traumatique, un évitement et émoussement affectif et une activation neurovégétative. La prise en charge de cette pathologie passe surtout par des psychothérapies (thérapie cognitivo-comportementale, thérapie de réexposition) ainsi que par des traitements pharmacologiques avec notamment la prise d'antidépresseurs qui permettent de diminuer les symptômes.

L'implication de l'hippocampe dans la vulnérabilité à cette pathologie a été bien documentée, on retrouve ainsi une diminution de son volume ainsi que des altérations fonctionnelles. Or, au sein de l'hippocampe, de nouveaux neurones sont formés à l'âge adulte et sont particulièrement impliqués dans des fonctions justement altérées dans le PTSD (mémoire, anxiété). On peut donc penser que ces néoneurones pourraient être impliqués dans le développement des symptômes de PTSD ainsi que dans leur sévérité.

L'utilisation d'un modèle animal est nécessaire pour une investigation approfondie. Il est possible d'induire expérimentalement la formation de nouveaux neurones par injection d'un produit : le tamoxifène, à une lignée de souris transgénique récemment développée.

Le but de cette expérience est d'évaluer les effets d'une injection de Tamoxifène sur la survie des nouveaux neurones dans l'hippocampe. Pour cela, nous souhaitons injecter du bromodésoxyuridine (BrdU) un analogue structurel de la thymidine. Le BrdU peut ainsi être incorporée dans l'ADN nouvellement synthétisé des nouveaux neurones à la place de la thymidine.

On testera 4 lots expérimentaux de 20 souris soit 80 souris au total.

Ces 4 expériences seront réalisées à différents temps (2, 4, 6 et 8 semaines après injection de tamoxifène).

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude :

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement des cages d'hébergement systématique (cabanes, tubes et smarthomes®).

Les expérimentateurs sont experts dans la préhension/contention des souris et sont soucieux d'éviter tout stress lors de la réalisation des procédures.

Afin de prévenir l'éventuelle douleur lors de l'injection un anesthésique local en gel sera appliqué au niveau du site d'injection.

Concernant les points limites, l'expérimentation sera arrêtée dès que l'une de ces limites sera atteinte : une immobilité ou une prostration de l'animal, une perte de poids supérieure à 15%, et une chute de température (diminution de 2°C et < 35°C). Si l'un de ces critères est atteint l'animal sera euthanasié. Ces paramètres seront évalués quotidiennement. Dès qu'un problème minime est détecté, on passe à deux évaluations par jour avec prise de température.

Remplacement : Ce modèle s'intéressant à la validation d'une mutation génétique, il ne peut s'entreprendre que sur l'animal vivant et aucune méthode de remplacement (par exemple, une étude *in vitro*) n'est envisageable. De plus, les analyses biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux.

Réduction : Les effectifs sont optimisés (n=10 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

10734 Un des défis majeurs sur la recherche de la maladie de Parkinson (MP) aujourd'hui est de déceler et traiter la maladie le plus tôt possible. Or, l'étude des gènes délétères identifiés chez des parkinsoniens permet de mieux comprendre la MP dès ses stades précoces. Parmi les gènes contribuant fréquemment au risque de développer la maladie figurent LRRK2, l'alpha-synucléine ou encore GBA1. Mieux comprendre leur fonction, permettra de mieux comprendre les mécanismes menant à la mort des neurones pour une majorité de patients. Dans cette étude, nous combinerons des techniques de traitements pharmacologiques et de transgénèse afin de comprendre leurs fonctions et voies de signalisation cellulaire dans lesquelles ils interviennent comme la synthèse des protéines, le trafic vésiculaire etc. Pour cela, plusieurs souches transgéniques de souris et de rats seront utilisées, impliquant les gènes cités plus hauts et d'autres intervenant dans le trafic cellulaire (VAMP7) et la traduction (MetRS). Ces animaux nous permettront d'étudier les modifications moléculaires, cellulaires et le comportement lié à la dérégulation de voies de signalisation dans la MP.

Un total de 5000 souris et 2500 rats seront inclus dans cette étude. Le respect du principe des 3R est garanti (explicité ci-dessous). D'une part, aucun test ne sera effectué pour lequel la réponse pourra être obtenue dans un système cellulaire (remplacement). L'étude portant sur l'analyse de régions du cerveau impliquées dans la MP et le comportement, les modèles chez l'animal sont les systèmes les plus adéquats pour ces études. D'autre part, les expérimentations seront sélectionnées principalement pour l'étude des phénomènes pour lesquels il existe une hypothèse claire provenant de données cellulaires et d'autres études chez l'animal (réduction). Finalement, un soin particulier sera pris à l'application des procédures afin d'obtenir les mesures les plus fiables possibles. Les animaux seront habitués à l'expérimentateur par des visites régulières, qui seront également l'occasion de vérifier leur poids et de surveiller leur apparence externe. Les animaux qui présenteraient des signes de souffrance manifestes seront immédiatement exclus de l'expérience et euthanasiés. (Raffinement).

Notre étude mènera à une meilleure compréhension des stades précoces de la MP, ainsi qu'au développement de nouveaux tests diagnostiques et de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de ralentir la progression de la maladie dès les premiers stades de la maladie.

10735 L'importance nutritionnelle et la compréhension des mécanismes biochimiques mis en jeu par les acides gras polyinsaturés au niveau cellulaire ainsi que la recherche de nouvelles voies thérapeutiques ou de prévention, représentent actuellement un enjeu de santé publique et scientifique. La problématique de ce projet se situe dans le cadre de la valorisation des ressources

naturelles dans l'optique d'élaborer un protocole de mesures des propriétés mécaniques des membranes cellulaires pour des applications de diagnostic médical et à visées thérapeutiques. Les cellules des mammifères sont limitées par une membrane lipidique dans laquelle s'insère des protéines. La nature et la densité de ces protéines varient fortement en fonction des types cellulaires mais aussi en fonction de leur environnement. Il résulte des différences de nature et de densité, des modifications des propriétés mécaniques de ces édifices cellulaires. La mesure des propriétés mécaniques des membranes entourant les cellules vivantes peut ainsi révéler/refléter leur état physiologique, stade de développement, leur état pathologique ou l'influence d'un agent externe tel qu'un médicament ou un virus, ou encore la réponse à une stimulation.

La problématique de ce projet se situe dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles dans l'optique de la prévention du risque cardiométabolique et de son traitement par l'utilisation de compléments alimentaires d'origine végétale. Dans ce cadre, et pour remédier à la diminution des ressources halieutiques, les micro-algues marines peuvent représenter un potentiel de par leur richesse en molécules biologiquement actives à haute valeur ajoutée telles que les oméga-3, les phytostérols et les pigments, molécules susceptibles de modifier les compositions membranaires des cellules. La plupart de ces molécules ont un impact sur différents paramètres biochimiques associés à des troubles métaboliques tels que les dyslipidémies, l'obésité ou le diabète.

Le modèle animal retenu, le rat mâle Wistar présentant une dyslipidémie d'origine nutritionnelle, nous permettra d'atteindre les objectifs visés à savoir l'amélioration des paramètres physiologiques et biochimiques des animaux et la corrélation avec les propriétés mécaniques des membranes des cellules telles que les globules rouges et les hépatocytes, grâce à des lyophilisats de micro algues utilisés en tant que complément alimentaire.

L'analyse nutritionnelle à partir de compléments alimentaires d'origine micro algue ne peut être conduite que sur un organisme animal entier afin d'avoir une réponse physiologique et afin de pouvoir déterminer ses répercussions biochimiques sur des tissus cibles spécifiques tels que le plasma et le foie. En outre les études menées sur les membranes des globules rouges nécessite d'avoir des cellules "fraîches" et en quantité suffisante pour mettre en évidence la corrélation entre les modifications biochimiques et mécaniques au niveau des membranes.

Vingt-quatre animaux seront utilisés pour cette étude. Les animaux sont hébergés dans une animalerie contrôlée (température, ventilation, hygrométrie, photopériode) répartis dans des cages par deux. Pendant une semaine, phase d'adaptation, les rats ont un suivi pondéral et la prise alimentaire est évaluée chaque jour, afin de savoir s'il n'y a pas un dominant par rapport à l'autre. L'évaluation de la prise alimentaire, se fait par détermination de la différence de pesée entre la quantité de nourriture mise à disposition la veille et celle restante. La quantité de nourriture renouvelée chaque jour est en quantité suffisante pour que les animaux aient un accès à volonté. Les cages utilisées (en plexiglas et munies d'une grille dans sa partie supérieure) permettent une disponibilité à volonté des aliments (bouchons) et de l'eau de boisson. En cas de problème observé (non prise de poids ou comportement non adapté (agressivité, posture recluse, poil hérissé) les animaux sont séparés puis des groupes sont à nouveau formés. Aucune intervention sur l'animal n'est effectuée durant le protocole nutritionnel. A la suite du protocole, les rats sont exsanguinés par ponction du sang au niveau de l'aorte abdominale, après administration d'un anesthésique additionné d'un analgésique. Une analyse statistique par ANOVA et test LSD est utilisée avec n=4 animaux pour avoir un lot homogène expérimental lors d'une étude nutritionnelle. Ce nombre d'animaux permettra de déterminer des moyennes associées à des écarts types.

10736 L'ostéosarcome (OS) est la tumeur osseuse maligne primitive la plus fréquente chez l'enfant et l'adulte représentant 40-60% des cas, troisième cause de cancer chez l'enfant. L'ostéosarcome des mâchoires (OS-M) représente 5 à 10% des ostéosarcomes et touche principalement la mandibule. Contrairement aux OS des os longs, il se distingue par un développement en dehors de la phase de croissance pubertaire (âge médian : 35 ans), un développement métastatique plus milité (20% à 2 ans) et un taux de survie supérieur (77% à 5 ans). Malgré ces chiffres, la prise en charge des patients demeure tardive, la localisation anatomique rend la chirurgie lourde et handicapante pour

les patients et enfin la récurrence locale atteint 50%. C'est pourquoi il est nécessaire de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces groupes de patients qui demeurent à haut risque.

Le développement tumoral en site osseux est associé à un dérèglement par les cellules tumorales de l'équilibre apposition / résorption osseuse, appelé « cercle vicieux » : les cellules tumorales induisent la production (directe ou indirecte via les cellules stromales ou les ostéoblastes) de facteurs activateurs des ostéoclastes (tels que RANKL, TNF, IL-6, PTH-rP...) qui vont induire la différenciation et l'activation de précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures capables de dégrader l'os. Lorsque la matrice osseuse est dégradée, elle va permettre la libération de facteurs de croissance stockés dans cette matrice qui vont à leur tour activer la prolifération des cellules tumorales. L'hypothèse thérapeutique développée dans le laboratoire est de bloquer ce cercle vicieux entre prolifération tumorale / résorption osseuse en ciblant à la fois les cellules tumorales et les cellules osseuses.

Le projet portera sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques des tumeurs osseuses primitives par l'utilisation de molécules, antisense, miRNA à activité anti-tumorale et/ou anti-résorption osseuse en monothérapie ou en bithérapie. Ces approches seront testées *in vivo* dans des modèles murins xénogéniques d'ostéosarcome de la mâchoire.

Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement du projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro*, et l'éventuelle application clinique. Elles sont incontournables avant une application clinique et ne peuvent être remplacées par des expérimentations *in vitro*. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative, à savoir 8 animaux par condition, à raison de 4 conditions par molécule à tester, soit un total de 32 animaux par expérimentation. Nous évaluons à 3 le nombre de molécules anti-résorption et 3 les molécules anti-tumorales, soit 6 molécules au total sur une période de 5 ans. Ces molécules seront testées à la fois en monothérapie dans des expériences d'effet-dose (3 doses testées) et en bithérapie. Chacune des expérimentations sera confirmée une fois. Si les résultats sont homogènes nous ne renouvelerons pas inutilement l'expérimentation selon la règle des 3R. Néanmoins, si les résultats des 2 expérimentations sont hétérogènes ou discordantes, nous renouvelerons l'expérimentation (pour un total de 3).

Il s'agit d'un protocole générique qui permettra de faire la preuve de concept préclinique de l'intérêt thérapeutique de certaines molécules pressenties après un premier screening *in vitro*. Un total maximum de 1152 souris immunodéficientes est prévue sur une période de 5 ans. Le bien-être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement, une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

10737 Une des questions non résolues à propos de l'évolution du langage chez les primates est de savoir si les réseaux du langage chez l'homme sont déjà présents chez les primates non humains, notamment le singe macaque. Chez l'homme, la sémantique verbale et non verbale du langage et du comportement social, implique les lobes occipital et frontal inférieur, reliés par les fibres du faisceau fronto-occipital inférieur (IFOF). Alors que les primates non humains sont capables de communiquer en utilisant les informations visuelles qui les entoure, l'existence de l'IFOF n'a pas été démontrée chez ces espèces et fait aujourd'hui toujours débat. Nous venons cependant de résoudre une partie de cette énigme en montrant l'existence de fibres de matière blanche reliant les cortex occipital et frontal inférieur chez le singe vervet, en tout point similaires à celle de l'IFOF chez l'homme. Nous avons pour cela réalisé pour la première fois chez les mêmes singes la tractographie de ce faisceau à partir de données d'imagerie par résonance magnétique de diffusion (IRMd) et la dissection réelle de ce même faisceau. L'IRMd permet de mettre en évidence *in vivo* les faisceaux de matière blanche du cerveau humain en mesurant la diffusion des molécules d'eau le long des fibres nerveuses. Il est alors possible par tractographie de reconstituer de proche en proche les trajets des faisceaux de fibres nerveuses.

Ces techniques ne permettent cependant pas d'affirmer que les fibres de matières blanches de cet IFOF connectent directement les régions fronto-occipitales sans un relai par une autre structure anatomique. La mise en évidence de telles connexions est un élément fondamental pour valider

l'existence de ce faisceau chez les primates non-humains. Nous proposons de réaliser une étude de traçage des fibres de connexion entre le lobe occipital et le lobe frontal inférieur chez le singe macaque afin de démontrer l'existence de connexions directes entre ces régions constitutives de l'IFOF. L'originalité de notre approche est tout d'abord de réaliser une acquisition *in vivo* en imagerie de diffusion afin de visualiser le faisceau IFOF de chaque animal en tractographie et de déterminer ainsi parfaitement les sites d'injections des traceurs. Notre but est de déterminer si le faisceau IFOF chez le singe macaque est constitué de fibres de connexions directes entre les régions frontales et occipitales, et de permettre une validation des données macroscopiques de tractographie et de dissection à l'échelle microscopique, c'est-à-dire à la résolution des axones neuronaux constituant les fibres de matières blanches. Il s'agit d'une question de recherche fondamentale où nous proposons d'étudier des projections anatomiques très précises, apparues très tardivement dans l'évolution. Cette étude ne peut donc pas être menée chez le rongeur, mais seulement chez le primate non-humain.

Au total, et selon les règles éthiques de réduction, 2 singes seront opérés et suivis dans cette étude. Les animaux seront hébergés ensemble, dans une structure spécialement agréée pour l'hébergement et l'utilisation des primates en recherche, disposant d'équipements et de protocoles adaptés au raffinement du milieu pour cette espèce (nourriture variée, jouets, fond sonore.). Toute intervention nécessaire à l'expérimentation sur l'animal sera réalisée sous anesthésie locale ou générale et complétée par l'utilisation d'analgésiques afin d'assurer le meilleur confort qui soit. Les points limites seront respectés ce qui nous amènera à prendre les dispositions qui s'imposent de la façon la plus précoce et la plus adaptée possible. Pour cela, tous les animaux seront surveillés pluri quotidiennement par nos techniciens animaliers et par les chercheurs formés et habitués à interagir avec ces espèces animales. Cela permettra de discuter au cas par cas des soins à apporter à l'animal en fonction des besoins.

10738 Le sepsis représente un défi majeur de santé publique et constitue la troisième cause de décès dans les pays industrialisés. Il s'agit d'une infection généralisée lors de laquelle deux phases peuvent être distinguées : une réaction initiale hyper inflammatoire s'accompagnant de défaillances d'organes multiples puis une seconde phase lors de laquelle on distingue une diminution des défenses immunitaires aussi appelée immunosuppression (IS). Celle-ci est responsable d'infections bactériennes secondaires nosocomiales et de réactivations virales grevant le pronostic des patients, augmentant leur durée de séjour hospitalier et générant un surcoût important pour la société. Sur le long terme, la persistance d'une IS pourrait favoriser la survenue de cancers.

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) exercent en conditions saines un rôle de contrôle du système immunitaire limitant les dommages collatéraux aux tissus sains pouvant être induits par l'exacerbation de la réponse inflammatoire. Or, durant le sepsis, il est constaté dès le 3ème jour une augmentation de la proportion de ces Tregs de façon concomitante à l'IS.

Nous avons montré lors d'un projet précédent intitulé « Etude du rôle du récepteur TNFR 2 sur les lymphocytes Tregs lors des états d'immunosuppression induite par le sepsis » que ces Tregs activés lors du sepsis diminuaient la prolifération des lymphocytes T conventionnels dans les jours suivant le sepsis et s'accompagnaient donc d'une paralysie du système immunitaire.

Le but de notre projet est de démontrer la persistance de ces mécanismes paralysant le système immunitaire dans le temps afin de développer des stratégies thérapeutiques permettant de les restaurer et d'épargner aux patients victimes d'un sepsis de développer secondairement des infections ou des cancers.

Ce protocole se divise en plusieurs parties :

- 1) Elaboration d'un modèle murin de Sepsis à *Staphylococcus aureus* guéri
- 2) Evaluation de l'évolution des populations T conventionnelles et régulatrices
- 3) Identification d'une IS tardive liée au sepsis
- 4) Rôle des Tregs dans cette IS
- 5) Phénotypage des Tregs aux différents temps suivant un sepsis

Pour réaliser ce projet, nous aurons besoin de 215 souris C57BL/6, de 180 souris DERE (DEpletion of REGulatory T cells) et 260 souris OTII (figure 5).

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). La mise en place du modèle comme l'évaluation de la cinétique des populations T et du rôle des Tregs dans l'IS tardive liée au sepsis ne peuvent être simplement réalisées *in vitro*. Le nombre de souris nécessaires a été calculé afin d'obtenir le minimum nécessaire requis pour une analyse statistique fiable. La mise en place d'une évaluation de la cinétique des populations par simples prélèvements sanguins itératifs à l'étape 2 permet une épargne de souris considérable. Aucun traitement antalgique spécifique n'a été mis en place puisque les procédures utilisées dans ce projet sont de courte durée, réalisées sous anesthésie générale, et n'induisent pas de douleur résiduelle. Cependant, une grille d'appréciation des points limites a été mise en place avec un système de barème de point afin de minimiser au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des souris et d'obtenir les informations pertinentes à moindre coût en termes de "bien-être" animal. Les souris sont hébergées dans des cages adaptées avec enrichissement et accès libre à l'eau et à la nourriture.

10739 Les pathologies broncho-pulmonaires, cancer pulmonaire et bronchopneumopathies chronique obstructive (BPCO), sont des maladies respiratoires graves en passe de devenir très prochainement les principales causes de mortalité mondiale. Le principal facteur de risque est le tabagisme mais il a été montré récemment qu'une mutation particulière, présente sur certains récepteurs à la nicotine, est fortement associée à l'incidence de ces pathologies pulmonaires. Il a été montré des altérations des capacités de réparation du poumon chez les souris exprimant cette mutation. Ces souris développent une réponse inflammatoire particulière et développent lentement et spontanément des lésions pulmonaires retrouvées dans la BPCO humaine.

Le but de notre projet est ici d'étudier, chez les souris portant cette mutation, certaines caractéristiques de l'inflammation pulmonaire et de démontrer que ces souris, en comparaison avec des souris ne présentant pas cette mutation, sont beaucoup plus sensibles à un stress oxydatif, connu pour être impliqué dans la genèse de la BPCO.

Notre projet, visant à étudier les remaniements tissulaires pulmonaires associés à cette mutation, est conditionné par l'utilisation de souris transgéniques exprimant la mutation d'intérêt. Ce projet ne peut être réalisé sur des cultures de cellules pulmonaires. En particulier, l'étude des remaniements histologiques pulmonaires, de la réaction inflammatoire et de la fonction respiratoire ne peut être réalisée qu'*in vivo* (Remplacement).

Nous avons restreint au minimum le nombre d'animaux utilisés. La plupart des protocoles expérimentaux envisagés sont maîtrisés par le laboratoire depuis plusieurs années. Nous en connaissons donc la variabilité expérimentale, et le nombre d'animaux à inclure dans chaque protocole est réduit au minimum. Les tests d'analyse statistique non paramétriques, adaptés aux échantillons faibles, sont systématiquement utilisés (Réduction). Ce projet sur 5 ans nécessite l'utilisation de 546 souris : 273 souris mutées (fond génétique C57BL/6J) et 273 souris témoins C57BL/6.

Les protocoles ont été systématiquement discutés avec un vétérinaire ; des anesthésiques et analgésiques seront utilisés lorsque nécessaires et les animaux seront surveillés au moins une fois par jour pour observer tout comportement anormal témoin d'une souffrance. Les animaux seront euthanasiés dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement). Une attention particulière est portée à l'enrichissement du milieu : sélection de litières propices à l'aménagement, utilisation en simultané ou en alternance de solutions d'enrichissement du milieu, eau et nourriture à volonté (Raffinement).

10740 Les nanotechnologies, définies comme l'ensemble des techniques visant à concevoir, caractériser et produire des matériaux à l'échelle du nanomètre, sont un domaine en pleine expansion. Les applications des nanotechnologies sont multiples et la santé ainsi que la médecine n'échappent pas à cette dynamique. L'utilisation de nanovecteurs particuliers offre aujourd'hui des réponses aux difficultés rencontrées par la thérapeutique classique. Elle consiste à intégrer un principe actif dans

un vecteur ou à utiliser des nanomatériaux pour adresser spécifiquement ce médicament à un tissu cible sans qu'il soit distribué ailleurs dans l'organisme. Les nanomédicaments pourraient donc améliorer la balance bénéfice-risque de médicaments en augmentant leur efficacité et leur biodisponibilité au niveau du tissu ou de l'organe cible, tout en réduisant les doses à administrer et le risque de toxicité. S'il existe d'ores et déjà plusieurs médicaments nanovectorisés utilisés dans le traitement du cancer, les perspectives sont plus larges et visent d'autres domaines thérapeutiques.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Elles se caractérisent par une inflammation pathologique du tube digestif qui touche le plus souvent des sujets jeunes âgés de 20 à 30 ans. Ces maladies dégradent très fortement et à long terme la qualité de vie des patients soulignant le besoin d'une thérapie anti-inflammatoire optimale. La pathogénèse des MICI est inconnue mais implique une réponse immunitaire intestinale dérégulée vis-à-vis du microbiote intestinal chez des hôtes génétiquement prédisposés et sous l'influence de facteurs environnementaux. Le but de notre projet est de développer des nanovecteurs pour délivrer des principes actifs dans le tractus gastro-intestinal afin de réduire l'inflammation intestinale en modulant la réponse immune et/ou le microbiote intestinal dans des modèles animaux de colites.

Afin de précisément évaluer l'impact de ces principes actifs nanovectorisés, deux types de colites induites par traitement chimique seront utilisés. En parallèle, le microbiote intestinal qui joue un rôle dans la pathogénicité des MICI pourra être modifié par différents moyens : i) traitements antibiotique et, ii) 3 cycles de traitement chimique induisant la colite. L'essentiel des prélèvements (sang, tissus, contenus intestinaux) sera fait post mortem à l'exception des fèces. Dans le respect de la règle des 3R, nous avons prévu d'utiliser au maximum les expérimentations *in vitro* sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Etant donné la variabilité observée dans ces expérimentations animales, nous utiliserons des groupes de 12 souris pour minimiser le nombre d'animaux tout en obtenant des résultats statistiquement interprétables. De plus, le bien-être animal sera pris en compte par la mise en place d'un enrichissement des cages (ajout de sopalin, petite maisonnette, briques en bois) ainsi qu'un hébergement en groupe (4 par cage). Dans le cas où un animal présenterait des signes de souffrance, il sera retiré de l'étude, tous les traitements seront stoppés et des soins adaptés pratiqués afin de réduire la douleur. L'étude de l'impact de ces principes actifs nanovectorisés impose d'utiliser un modèle animal pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations *in vitro*. En effet, il n'existe pas aujourd'hui de modèle *in vitro* récapitulant les paramètres du tube digestif. De plus, l'ensemble des procédures proposées sont spécifiques de modèle *in vivo* et ne pourrait être fait dans d'autres contextes. Sur la durée totale du projet (5 ans) 6960 souris seront utilisées. Chacune des expérimentations est effectuée avec des doses adaptées n'engendrant pas de mortalité et les conditions d'euthanasie sont clairement définies.

10741 Les maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington sont une préoccupation croissante en terme de santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de cette maladie.

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

Nous avons déjà établi la preuve de concept de notre stratégie dans deux modèles murins (souris) pour la maladie de Huntington où la surexpression d'une enzyme du métabolisme du cholestérol à l'aide d'un vecteur AAV permet de corriger les anomalies neuropathologiques et comportementales chez la souris malade.

Le but final de cette étude est de compléter toutes les étapes d'évaluation avant de proposer cette approche thérapeutique chez les patients à un stade précoce de l'évolution de la maladie de Huntington.

Pour cela nous avons besoin d'optimiser les conditions de l'injection intra-cérébrale et d'évaluer la tolérance chez une autre espèce de rongeurs, en particulier, le rat (volumes et titres/concentrations de vecteurs injectés).

Différents lots de vecteurs à différentes concentrations seront évalués dans le cadre d'études de toxicité chez le rat sain en utilisant des conditions cliniques portant sur l'effet bénéfique potentiel du vecteur dans deux modèles murins pour la MH.

L'utilisation du modèle Rat pour compléter le modèle Souris se justifie notamment par la possibilité d'accéder à une analyse plus précise des tissus cérébraux, du fait de sa taille plus conséquente. Par ailleurs, une analyse comportementale des animaux pourrait être mise en place suite à ce projet et sera plus aboutie chez cette espèce.

Remplacement : Le recours aux modèles animaux est essentiel, car aucun type de culture cellulaire ou système synthétique ne permet à ce jour de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles. Tous les vecteurs AAV et les préparations utilisées seront caractérisés *in vitro* avant leur utilisation chez l'animal. Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité dans des élevages agréés.

Raffinement : Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage/utilisation, et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe certifient le bien-être des animaux. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les rats recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Réduction : Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. Leur nombre (68) a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider la tolérance d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être considérée comme cible dans plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, des travaux précédents, dans d'autres espèces (souris) ont permis d'établir les concentrations/doses de virus à injecter et les temps d'analyses. Enfin l'utilisation du modèle rat nous permettra de démontrer la possibilité de réaliser les études de Toxicité dans ce modèle et ainsi d'éviter le recours aux primates non humain.

10742 CONTEXTE

La transplantation d'organes, en particulier cardiaque, est face à une crise récurrente : la pénurie de greffons. Le manque crucial d'organes est en effet responsable de la première cause de mortalité en transplantation cardiaque. Afin d'optimiser le nombre de prélèvements et d'assurer une protection optimale des greffons cardiaques, notre équipe a inventé un nouveau procédé de transport par perfusion hypothermique qui permettrait de multiplier par 4, la durée de préservation du cœur. Ce dispositif a fait l'objet de 2 brevets et a été récompensé par le prix de l'innovation INSERM 2015.

Par ailleurs, le projet présenté vient d'être financé par l'ANR (Juillet 2018) pour une durée de 4 années.

OBJECTIF

Notre objectif est d'optimiser la survie du greffon cardiaque grâce à un nouveau procédé de transport des greffons, innovant, mis au point dans notre laboratoire. Les études précliniques expérimentales proposées seront menées chez le porc, comme présenté dans le dossier ANR. Ces travaux doivent permettre un passage du procédé en clinique humaine dans les 3-4 prochaines années.

TYPE DE RECHERCHE Translationnelle

Nos objectifs sont triples :

1- Prolonger le temps de préservation du greffon cardiaque.

2- Optimiser les conditions de survie des cœurs prélevés arrêtés.

3- Développer une méthode originale et non invasive d'évaluation de la viabilité du greffon par l'analyse :

3a- des résistances coronaires (mesure par micodébitométrie et imagerie US par microbulles),

3b- de l'élasticité du tissu myocardique (mesure par élastographie ultrasonore et IRM),

3c- de l'œdème et de la perméabilité vasculaire (imagerie par Scanner Spectral X et IRM de diffusion),

3d- du statut énergétique du greffon (mesure par spectroscopie RMN).

MODELE ANIMAL

Pour nous rapprocher au mieux des conditions cliniques, et sur une optique translationnelle, nous mènerons nos travaux chez le porc. Nous avons choisi cette espèce animale en particulier, du fait de la proximité anatomique et physiologique du cœur de porc avec le cœur humain.

136 animaux et 4 années seront nécessaires pour répondre à l'ensemble des questionnements scientifiques et médicaux, et parvenir à la phase translationnelle chez l'homme.

DOULEUR-SOUFFRANCE ANIMALE

Tous les travaux se dérouleront sur des animaux profondément anesthésiés. L'euthanasie aura lieu durant la phase d'anesthésie (induction d'un arrêt cardiaque in situ) et donc sans réveil de l'animal. Le seul moment où l'animal est susceptible de ressentir un stress est l'induction de l'anesthésie.

Les procédures expérimentales utilisées ne laissent aucune place à la douleur, ou à la souffrance de l'animal.

REGLE DES 3 R

- Nous ne pouvons remplacer le cœur de porc par un autre modèle, car il s'agit du modèle gold standard pour ce type d'expérimentations, en ischémie cardiaque et transplantation. En revanche :

- Dans le cadre de la "Réduction", le nombre d'animaux par groupe a été calculé pour être minimal, tout en apportant la réponse médicale et scientifique attendue.

- Concernant le "raffinement", notre laboratoire est en contact avec d'autres équipes (laboratoires), disposées à récupérer du matériel biologique issu de ces animaux (peau, oreilles, sang, reins.), en post-mortem. De plus, un laboratoire de santé animale fournira une quarantaine de porc (sur les 136), qui au lieu d'être euthanasiés chez eux, seront gracieusement donnés et serviront à nos études, confortant encore le respect de la règle des 3R.

- Enfin, de nombreuses petites actions de raffinement seront mise en place comme : le passage régulier de l'animalier dans l'enclos, le fait que celui-ci habitue le porc à sa présence, le caresse au niveau du cou, l'utilisation d'une crème de type Lidocaine appliquée au niveau du cou avant l'anesthésie, et pour finir, l'utilisation d'une seringue + prolongateur, permettant l'induction de l'anesthésie à distance (donc avec moins de stress) de l'animal.

METHODOLOGIE

Deux procédures sont programmées, nécessitant 136 animaux évaluant :

- Procédure 1) L'efficacité de la perfusion hypothermique longue durée (20H à 4°C) par notre nouveau procédé de transport, versus l'immersion. N= 72 animaux.

- Procédure 2) L'efficacité de notre nouveau procédé de transport pour protéger les cœurs arrêtés (= cœurs DCD, c'est-à-dire prélevés non battants après arrêt circulatoire). N= 64 animaux.

RESULTATS ATTENDUS

Le transfert de notre nouveau procédé de transport en clinique humaine permettra de :

- Prolonger la durée de préservation du cœur d'un facteur 4 (voir davantage), permettant des échanges de greffons, au moins à l'échelle européenne.

- Augmenter le nombre de greffons, par l'utilisation des cœurs marginaux ou prélevés non battants.

- Valider une méthode d'évaluation fiable et non-invasive de la viabilité du greffon, applicable sur cœur battant comme sur cœur arrêté.

10743 Dans le système nerveux, l'information se propage le long du neurone par des petits courants électriques dit potentiels d'action pour se transmettre aux autres neurones avec lequel il est connecté. Cette communication se fait au niveau de la synapse où le signal électrique est converti en signal chimique. Cette synapse est donc faite de 3 éléments : la terminaison du neurone présynaptique, la fente synaptique et la terminaison du neurone postsynaptique. Quand le signal électrique arrive au niveau de la présynapse, un neurotransmetteur est libéré dans la fente synaptique et comme une clé dans une serrure, va activer des récepteurs spécifiques insérés dans la membrane du neurone postsynaptique. Ces récepteurs permettent de transformer à nouveau ce signal chimique en signal électrique qui va continuer sa propagation. La connexion entre deux neurones n'est pas figée, mais dépend des activités antérieures des neurones et de l'« utilisation » de cette connexion et ceci grâce à la plasticité synaptique qui est la propriété que les synapses ont de changer en force en fonction de l'usage qui en est fait. Elle permet d'expliquer de nombreuses formes de mémoire simple présentes chez tous les individus présentant un système nerveux, même peu développé.

La neurotransmission peut donc être excitatrice, inhibitrice ou modulatrice. La transmission excitatrice se fait principalement grâce au glutamate, un acide aminé. Les récepteurs au glutamate permettent le phénomène de potentialisation à long terme (ou LTP en anglais) qui est un renforcement persistant des synapses en produisant une augmentation de longue durée dans la transmission du signal entre deux neurones. Notre groupe travaille sur ce phénomène complexe de LTP encore mal connu et a déjà montré l'importance des mouvements des récepteurs dans la membrane au voisinage de la synapse. Notre synapse modèle est celle de la région de l'hippocampe de rongeur, connue pour son implication dans les phénomènes de mémoire et d'apprentissage. Dans des travaux précédents, nous avons utilisé des anticorps spécifiques pour perturber le mouvement des récepteurs en les immobilisant pour étudier la LTP et mesurer les conséquences de cette immobilisation sur les phénomènes de mémoire. Notre laboratoire développe d'autres outils moléculaires pour une meilleure modulation de cette immobilisation. Ils seront injectés par stéréotaxie dans le cerveau de souris et leur efficacité sera validé par des études électrophysiologiques *ex vivo* sur des tranches des cerveaux prélevés.

Ce projet utilisera 240 souris C57BL6/J durant ce projet de 3 ans. Mais dans le respect du R de réduire de la règle des 3R, nos groupes expérimentaux seront dimensionnés pour utiliser le plus petit nombre possible d'animaux pour avoir néanmoins des statistiques solides. Dans le souci du R de raffiner, nous soulagerons les douleurs générées durant les chirurgies par des molécules antalgiques les plus adaptées. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur vie avec une surveillance quotidienne par du personnel compétent. Ils auront accès en permanence à l'eau et à de la nourriture de qualité constante, préparé spécifiquement pour leurs besoins physiologiques. Ils seront hébergés en groupe sociaux dans des hébergements enrichis avec des éléments qui leur permettront de reproduire leurs comportements naturels. Dans le cadre de leur suivi quotidien comme au cours des procédures, des points limites seront définies pour éviter ou limiter toutes souffrances.

10744 L'infarctus du myocarde, lié à une ischémie d'une partie du tissu cardiaque, reste l'une des causes principales de décès chaque année. L'étude de son fonctionnement, mais surtout des phénomènes dits « cardioprotecteurs » pouvant aboutir à la protection du tissu cardiaque, est donc une priorité. Ainsi, notre unité travaille depuis de nombreuses années sur la compréhension des mécanismes liés à ces phénomènes. L'intérêt, à terme, est de pouvoir développer des outils pharmacologiques capables de mimer ces phénomènes et donc de réduire les lésions cardiaques post-infarctus et les dysfonctionnements fonctionnels et métaboliques associés.

Dans cette optique nous avons développé un modèle murin d'ischémie-reperfusion qui nous permet de réaliser des études sur la taille de l'infarctus, ainsi que des études fonctionnelles, biochimiques et biomoléculaires. Ce modèle nécessite un acte chirurgical incluant l'ouverture du thorax, par ailleurs parfaitement maîtrisé au laboratoire, impliquant une parfaite prise en charge post-opératoire des animaux.

Dans ce projet, il est question de mesurer la cinétique d'activation de certaines voies de signalisation, impliqués dans la mort du tissu cardiaque, tout au long d'un épisode d'ischémie-reperfusion. Pour cela, nous aurons recours notamment à des animaux chez lesquels certaines protéines de ces voies sont absentes, ainsi qu'à des inhibiteurs pharmacologiques de ces voies. A ce jour, les données de la littérature restent en effet très incomplètes sur ce sujet. Après des premiers tests menés *in vitro*, nos travaux visent en particulier à clarifier le rôle de ces voies de signalisation durant un phénomène appelé « conditionnement ischémique », connu pour être cardioprotecteur.

Prise en compte des 3R :

Remplacement : Afin de limiter l'utilisation des animaux, la mise au point des anticorps nécessaires pour l'analyse protéique et la caractérisation des doses efficaces des inhibiteurs des voies de signalisation ont préalablement été réalisées sur une lignée cellulaire adaptée (étude *in vitro*). Une phase test sera par ailleurs réalisée pour vérifier l'absence de toxicité aiguë et la réalité de l'efficacité de l'injection des inhibiteurs chez les animaux. L'obtention d'une dose d'inhibiteur efficace et sans effet toxique aiguës est considéré comme un prérequis à la réalisation des expériences décrites dans la phase 2. Enfin, toujours dans le but de limiter l'utilisation des animaux, nous nous baserons sur les données cinétiques de l'expression de gènes ciblés de notre précédent projet.

Réduction : Un test de puissance a été réalisé pour déterminer le nombre d'animaux minimum nécessaire pour obtenir des résultats analysables statistiquement pour cette étude. Ainsi, ce sont au maximum 135 souris âgées de 8 à 14 semaines au moment de l'expérimentation, qui participeront à cette étude. Le prélèvement (puis conservation) d'autres tissus que le cœur est envisagé en concertation avec l'ensemble du laboratoire au moment de la réalisation du projet afin d'optimiser et de valoriser au mieux les prélèvements.

Raffinement : Pour garantir le bien-être des animaux dès leur arrivée, un enrichissement est mis à disposition des animaux puis renouvelé très régulièrement jusqu'à l'expérimentation. Pour limiter au maximum la douleur et souffrance de l'animal tout au long de l'expérimentation, la chirurgie est intégralement réalisée sous anesthésie profonde et analgésie adaptée. De plus, un suivi post-opératoire strict est mis en place avec intervention du vétérinaire référent, le cas échéant. Le prélèvement des tissus interviendra, selon les groupes, au plus tard 24h après la chirurgie. Les groupes sociaux des animaux seront conservés après réveil.

10745 Selon les études épidémiologiques, le taux de personne atteinte de dépression dans la population française est d'environ 15%. Il a été établi qu'en l'absence de traitement, 15% des patients succombent à la suite d'un suicide et qu'entre 60 et 80% des suicides (entre 10000 et 15000 par an en France) sont le fait d'individus porteurs d'un diagnostic de dépression. Les médicaments utilisés dans les traitements de la dépression ont des effets secondaires majeurs qui conduisent souvent à l'arrêt du traitement. De plus, dans 50% des cas la maladie résiste aux traitements médicamenteux. Ainsi, la recherche dans le contexte des troubles dépressifs consiste d'une part à cerner les mécanismes sous-jacents de la maladie et d'autre part à trouver des médicaments efficaces sans effets secondaires majeurs. Les modèles de dépression basés sur l'analyse du comportement de rats ou de souris demeurent à l'heure actuelle les plus pertinents et les seuls validés par la communauté scientifique. Ces modèles ont permis d'étudier les mécanismes physiopathologiques des troubles dépressifs et permettent ainsi de développer de nouveaux traitements, pharmacologiques ou comportementaux.

Dans ce projet, nous nous proposons d'utiliser des tests d'évaluation du niveau de dépression chez la souris afin d'étudier l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques antidépressive. Dans ce test nous mesurons la réaction de l'animal dans une situation de nage ou de suspension.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R,

Remplacer : Bien qu'il soit possible de disséquer les mécanismes d'action des nouveaux médicaments *in vitro*, les réponses comportementales des animaux induites par ces nouveaux traitements sont des événements difficiles à simuler et à prédire par des expériences *in vitro*. De plus, ces expérimentations permettent de faire un lien avec une éventuelle application clinique. Elles

sont ainsi incontournables avant une étude clinique et ne peuvent être remplacées par des expérimentations *in vitro*.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesures sont mises en œuvre notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement adaptées (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis. Les procédures mises en œuvre dans ce projet n'induisent pas de douleur, ainsi aucun traitement de la douleur ne sera administré.

Réduire : nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 10 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 2500 souris et de 1500 rats est envisagée.

10746 La mise en œuvre de ce protocole vise la compréhension et l'identification des structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués au cours de l'apprentissage, de l'expression et de l'extinction de la peur conditionnée chez la souris. 600 souris C57BL6/J seront utilisées. Les objectifs principaux de ce protocole sont doubles : premièrement, l'utilisation de modèles comportementaux permettant l'étude de la peur conditionnée chez le rongeur vigile et, deuxièmement, l'identification et la manipulation des structures cérébrales et circuits neuronaux permettant l'expression et/ou l'inhibition des réponses comportementales de peur apprises à la suite du conditionnement et de l'extinction de la peur conditionnée. L'extinction de la peur conditionnée chez le rongeur est un analogue des thérapies d'exposition chez l'être humain souvent utilisées dans le cadre de pathologies anxieuses telle que le syndrome de stress post-traumatique qui se caractérise par la persistance de mémoires traumatiques à la suite du traitement. L'utilisation d'un modèle comportemental chez le rongeur permettant l'étude des structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués dans le maintien des réponses traumatiques de peur nous permettra à terme le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour des pathologies telles que l'anxiété ou le syndrome de stress post-traumatique.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'identification des structures cérébrales et des circuits neuronaux impliqués au cours de l'apprentissage de la peur conditionnée nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes *in vivo* telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne contiennent pas les connexions neuronales qui sont le sujet de nos travaux. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire : le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est donc de 15 souris par groupe, soit un total de 600 animaux pour la réalisation de ce protocole.

Raffiner : afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes seront utilisées :

Nous appliquons systématiquement un traitement antalgique (Métacam, 0.01 ml, 5mg/ml, i.p.) avant et trois jours suivant les actes chirurgicaux. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie gazeuse (isoflurane)

Pour identifier les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons définis des points finaux établis sur la base de la grille d'évaluation de Morton et Griffith établie en 1985. Cinq aspects sont évalués au cours de nos expériences et nous aident à déterminer un point final à l'expérimentation. Ces critères sont : la variation du poids de l'animal, son apparence physique (est-ce qu'il se toilette correctement et le poil a-t-il un aspect brillant), les signes cliniques observables que sont la fréquence cardiaque et respiratoire, les changements comportementaux non provoqués et la

réponse à des stimuli environnementaux. Chaque critère est évalué de 0 à 3, si un critère obtient un score de 3, ceci induit un arrêt immédiat de l'expérience et l'euthanasie de l'animal.

L'évaluation du poids de l'animal est effectuée de façon journalière à partir du moment où l'animal est isolé en cage individuelle et rentre dans la phase expérimentale. Ces mesures ont lieu lors de la manipulation journalière des animaux. Les mesures sont consignées dans un cahier d'expérience prévu à cet effet.

10747 Les dysfonctionnements de barrières d'organes (épithéliales et endothéliales) sont au cœur de nombreux processus pathologiques, notamment dans le cas des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI). Chez des patients atteints de MICI, on observe une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale (BEI) ainsi qu'une diminution de ses capacités de réparation. De plus, les MICI sont associées à divers atteintes extra-digestives, telles des troubles du comportement (anxiété), des pathologies bronchiques (asthme), ou cutanées (psoriasis). Ce projet testera l'hypothèse selon laquelle les dysfonctions de la BEI observées lors des MICI (1) sont observables au niveau d'autres barrières (peau, BHE et épithélium pulmonaire), et (2) sont modulables par le microbiote. L'objectif de ce projet est d'étudier les changements de perméabilité et de niveau d'inflammation des barrières dermique, pulmonaire, hématoencéphalique et intestinale au cours du développement de colite dans un modèle murin. Le deuxième objectif est d'analyser l'impact d'un changement du microbiote sur l'évolution de cette colite. Pour cela une supplémentation en prébiotiques sera effectuée pendant la gestation des mères et les barrières seront analysées chez les descendants mâles. Nous utiliserons cet enrichissement car il a déjà été montré que pendant la gestation et l'allaitement un tel régime protège du développement de l'allergie. Cette étude nécessite le recours à des animaux car il n'existe actuellement pas de modèle *in vitro* permettant de reproduire la complexité du tube digestif (nombreux types cellulaires différents) et son contenu (microbiote).

Pour tenir compte du principe des 3R (limitation des effectifs, raffinement des conditions d'hébergement des souris en ajoutant des igloos ou des tunnels dans les cages leur permettant de jouer, de se cacher, remplacement quand possible), nous utiliserons les descendants mâles alors que les femelles seront utilisées dans un autre protocole de développement de l'allergie. Nous effectuerons un suivi régulier du comportement et de la masse corporelle de chaque animal, pouvant traduire une douleur ou une détérioration de l'état général. Nous comparerons le développement de colite dans des souris provenant de mères dont l'alimentation a été supplémentée en prébiotiques pendant la gestation, ou non. Afin d'éviter la déshydratation suite à la colite et dans un souci de réduction de la douleur, nous humidifierons des croquettes avant de les disposer dans la cage et celles-ci seront renouvelées quotidiennement. La moitié de chacun des groupes recevra du Dextran Sodium Sulfate (manière aiguë ou chronique) pour développer une colite. Les expériences seront reproduites 2 fois de manière indépendante et ce projet nécessitera 144 animaux (souris balb/c) maximum.

10748 L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes et d'identifier les circuits neuronaux impliqués au cours de l'apprentissage, de l'expression et de l'extinction de la peur conditionnée chez la souris. L'extinction de la peur conditionnée chez le rongeur est un modèle des thérapies d'exposition chez l'être humain souvent utilisées dans le cadre de pathologies anxieuses telles que le syndrome de stress post-traumatique qui se caractérise par la persistance de mémoires traumatiques à la suite du traitement. L'utilisation d'un modèle comportemental chez le rongeur permettant l'étude des circuits neuronaux impliqués dans le maintien des réponses traumatiques de peur nous permettra à terme le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour des pathologies telles que l'anxiété ou le syndrome de stress posttraumatique.

Les animaux subissent une chirurgie peu douloureuse. Une fois leur récupération complète, ils sont soumis à un événement désagréable (léger choc électrique non douloureux) qui induit un stress ponctuel. Cet événement est associé à un contexte particulier (son ou environnement). Le son ou l'environnement sont donc associés pour l'animal au choc électrique. Les souris sont ensuite

exposées uniquement au son ou à l'environnement ; leurs réactions sont observées, ainsi que les structures cérébrales activées par ce phénomène de peur conditionnée.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'identification des circuits neuronaux impliqués au cours de l'apprentissage de la peur conditionnée nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes *in vivo* telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne contiennent pas les connexions neuronales qui sont le sujet de nos travaux. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire : le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est donc de 15 souris par groupe, soit un total de 720 souris pour la réalisation de ce protocole.

Raffiner : afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes seront utilisées :

A leur arrivée, les animaux sont mis en cage par l'animalier qui effectue un premier contrôle de leur état de santé. Les animaux bénéficient d'une période d'acclimatation, dans des cages collectives et bénéficient d'un enrichissement constitué d'un nid végétal. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser. A la suite de cette période d'acclimatation, les animaux sont placés en cages individuelles qui bénéficient également d'un enrichissement par nid végétal. Les souris sont habituées à la manipulation ; elles ne sont donc pas stressées en présence de l'homme et lors des manipulations. La durée de l'isolement des animaux n'excède pas 2 mois.

Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale. Un traitement antalgique est systématique ; il est administré avant et trois jours suivant les actes chirurgicaux pour prévenir toute douleur. L'hébergement individuel des animaux est limité au maximum, et leur environnement est enrichi.

Pour limiter les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons définis des critères d'observation qui permettent d'évaluer l'état de santé et le bien-être des souris. Si les points limites que nous avons fixés sont franchis, l'expérience est immédiatement interrompue et l'animal concerné est euthanasié.

Cette évaluation est réalisée quotidiennement à partir du moment où l'animal est isolé en cage individuelle et rentre dans la phase expérimentale. Ces mesures ont lieu lors de la manipulation journalière des animaux. Les mesures sont consignées dans un cahier d'expérience prévu à cet effet.

10749 Le Roaccutane® (isotrétinoïne, 13-cis l'acide rétinoïque) est le seul traitement curatif de l'acné vulgaris, une maladie dermatologique chronique très fréquente. Toutefois, dans environ 4% des cas, l'utilisation d'isotrétinoïne est associée à la dépression et au suicide. Bien que la prévalence de ce phénomène suggère l'existence de facteurs de susceptibilité génétiques, l'origine des effets secondaires n'est pas connue ; il n'existe pas non plus d'outils de diagnostic ou pharmacologiques afin de les prévenir, outre l'utilisation d'antidépresseurs classiques. La dépression sévère, en plus d'être un effet secondaire important du traitement à l'isotrétinoïne, fait partie d'un grand groupe hétérogène de troubles dépressifs associés au stress, et constitue le premier poste de dépense en santé dans les pays à revenu élevé. Les traitements existants ne sont efficaces que dans 65% des cas et nécessitent plusieurs semaines avant de faire effet.

Nos données démontrent, dans le modèle animal, la pertinence des facteurs génétiques de susceptibilité à développer des comportements dépressifs sous isotrétinoïne. Notre projet a comme objectif : (1) d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires d'une telle susceptibilité et (2) de proposer des méthodes de prévention et de traitement de la dépression induite par l'isotrétinoïne, (3) de déterminer l'utilité de ces données pour le traitement de la dépression associée au stress. Dans ce but, nous allons utiliser des souris génétiquement modifiées (modèles pertinents pour démontrer la susceptibilité à la dépression) ainsi que des modèles animaux utilisés dans la recherche sur la dépression et sur la neuro-inflammation.

Les données obtenues auront une répercussion immédiate sur l'avenir du traitement de l'acné par l'isotrétinoïne mais aussi sur les perspectives de traitement de la dépression. Nous pourrions proposer : (a) des biomarqueurs de diagnostic de susceptibilité, (b) des méthodes pour prévenir ou traiter des comportements dépressifs dans des conditions précliniques, (c) des traitements anti-inflammatoires utiles dans le traitement de la dépression mais aussi pour la prévention de la neuro-dégénérescence.

Il n'est pas possible de REMPLACER les modèles murins par un autre modèle animal dans cette étude pour deux raisons principales : (i) une analyse des fonctions cérébrales telle que la motivation ne peut se faire que chez un animal vivant ; (ii) la souris est notre modèle de référence car c'est dans ce modèle que nous avons identifié la susceptibilité génétique et pharmacologique à développer le comportement dépressif associé aux rétinoïdes. Dans une optique de raffinement nous avons identifié *in vitro* (cultures cellulaires et analyses moléculaires du matériel biologique provenant de la souris) les interactions protéiques qui peuvent être à l'origine des troubles dépressifs chez la souris. Afin de REDUIRE le nombre d'animaux utilisés dans cette étude nous allons : (I) utiliser des petits groupes d'animaux pour des expériences pilotes dont le résultat sera déterminant pour la continuation ou non de la série expérimentale en cours (la stratégie GO/NO-GO) et (II) nous utiliserons les mêmes animaux que pour les tests comportementaux pour certaines études de neuro-inflammation.

Au total un maximum de 1149 souris sera utilisé dans ce projet.

Enfin en vue de RAFFINER les procédures, les animaux feront l'objet d'un suivi adapté et de soins vétérinaires au besoin. De plus, toute procédure chirurgicale sera réalisée sous anesthésie générale accompagnée des médicaments antidouleurs appropriés.

10750 Cette étude vise à déterminer les effets des protéines GASP1 et GASP2 sur la régénération post-blessure du muscle squelettique chez la souris. La régénération musculaire est un processus largement étudié depuis de nombreuses années. Cette capacité de réparation du muscle est rendue possible notamment grâce aux cellules souches musculaires adultes, appelées cellules satellites. À l'état basal, ces cellules sont quiescentes. Lors d'une lésion, elles sont activées, prolifèrent puis fusionnent pour former de nouvelles fibres remplaçant les fibres musculaires lésées.

Les protéines GASP sont des inhibiteurs de la myostatine. La myostatine est elle-même un inhibiteur puissant du développement musculaire. Notre équipe a conduit différents travaux montrant le pouvoir pro-hypertrophique des deux protéines GASP. Une première étude *in vitro* a montré que le traitement de cellules musculaires (C2C12) par la protéine GASP-1 ou GASP-2 entraîne une augmentation de leur prolifération et de leur différenciation (Brun et al 2012 ; Perie et al, 2016). Des études *in-vivo* ont montré que la surexpression ubiquitaire des protéines GASP chez la souris (souris TgGasp-1 ou TgGasp-2) entraîne une augmentation du poids des muscles due à une hypertrophie des fibres musculaires (Monestier et al, 2012). Enfin, une récente étude a permis de montrer que des cellules primaires (cellules satellites) surexprimant Gasp1 ou Gasp2 et provenant des souris TgGasp, prolifèrent et se différencient plus rapidement que des cellules primaires de souris sauvages (Brun et al, 2014).

Par conséquent, nous émettons l'hypothèse que le processus de régénération musculaire pourrait être significativement affecté chez ces souris mutantes. Ces différentes données nous poussent à nous intéresser au pouvoir des protéines GASP à entraîner une augmentation de la régénération musculaire lors de blessure.

Nous envisageons donc d'étudier la régénération musculaire de ces souris suite à une blessure, induite par une injection très localisée de toxines dans le muscle tibial et sous traitement anesthésique et analgésique. La lésion sera ainsi restreinte à une petite portion d'un seul et même muscle, ce qui limite fortement la gêne et la douleur occasionnées chez l'animal. Cette étude nous permettrait ainsi de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels les cellules satellites peuvent réparer un muscle lésé. Nous espérons ainsi mettre en évidence des molécules d'intérêt impliquées dans ce mécanisme, ouvrant des perspectives vers d'éventuelles applications thérapeutiques. Dans un souci de conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et

de raffinement (règle des 3R), nous utiliserons un même individu pour plusieurs expérimentations (prélèvements post-euthanasie), avec néanmoins 56 souris mâles par lignée (la lignée contrôle FVB et les lignées transgéniques TgGasp-1 et TgGasp-2). Il n'y a actuellement pas d'alternative à l'utilisation des animaux d'expérimentation pour étudier la régénération musculaire après induction d'une lésion de manière chimique ou mécanique.

Le stress, la douleur et les différentes contraintes imposées aux animaux lors des expérimentations seront réduits au maximum, par administration d'anesthésiques et d'analgésiques. Une surveillance quotidienne sera effectuée au cours de l'expérimentation et les animaux montrant des signes de douleur trop intenses ou trop durables (évalués par l'observation des animaux, la reconnaissance de signes spécifiques et des points limites) seront euthanasiés

10751 Ce projet vise à mieux comprendre les bases neurobiologiques de la motivation chez les primates. En plus de sa composante affective, la motivation est une fonction biologique fondamentale qui permet à un individu d'ajuster son comportement en fonction de son état interne et de son environnement. Par ailleurs, la motivation est perturbée dans de nombreuses maladies neurologiques et psychiatriques comme la maladie de Parkinson ou la dépression. Pour mieux comprendre les processus cérébraux sous tendant les aspects physiologiques et pathologiques de la motivation, nous mesurerons l'activité neuronale chez des singes rhésus entraînés à effectuer des tâches comportementales. Nous étudions des structures corticales comme le cortex préfrontal et des structures sous-corticales comme la substance noire et le locus coeruleus. Pour étudier les relations entre l'activité neuronale, et des processus motivationnels comme la prise de décision et la gestion de l'effort, nous manipulons systématiquement la valeur des récompenses et le niveau de difficulté des tâches comportementales qu'effectuent les singes. Pour évaluer le rôle de neuromodulateurs comme la dopamine, la noradrénaline ou la sérotonine, nous manipulons leurs niveaux avec des drogues utilisées couramment en clinique (par exemple citalopram, clonidine, haloperidol, clozapine). Nous évaluons l'effet de ces drogues sur le comportement et l'activité neuronale. Afin de raffiner la manipulation de l'activité cérébrale, nous développerons également une approche pharmacogénétique (DREADDs). Ces expériences devraient permettre à la fois une avancée dans la compréhension des bases cérébrales de la motivation, mais également un développement plus efficace de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les patients. Tous les traitements que nous effectuons sont réversibles et les animaux sont élevés en groupe, ce qui permet un bon maintien de leurs relations sociales et ainsi de leur bien-être. Ces animaux ne devraient donc avoir aucune séquelle physique ou psychologique et nous prévoyons, à terme, d'en réhabiliter le plus possible dans un centres d'accueil agréé. Ces travaux devraient impliquer 8 singes rhésus (macaca Mulatta). Ainsi, en application de la règle des 3 "R", nous avons réduit le nombre d'animaux en réutilisant les singes pour les procédures non-traumatisantes et nous avons raffiné les méthodes de neurophysiologie et d'inactivation réversible (pharmaco-génétique). Le remplacement n'est pas possible pour cette étude qui vise à comprendre le comportement et le cerveau des primates.

10752 Dans le contexte actuel de réduction de sucres dans les aliments ou les boissons (avec pour objectif notamment la diminution du risque de développement de l'obésité et du diabète de type 2), l'industrie agro-alimentaire essaie de trouver de nouvelles solutions apportant du goût sucré mais avec moins de calories ou un apport nutritionnel complémentaire comme les fibres par exemple.

Dans le cadre du développement de nouveaux produits, la mesure de la réponse glycémique en comparaison au glucose est une méthode indirecte pour vérifier que les nouveaux ingrédients (constitués de molécules de glucose reliées par différents types de liaison) sont entièrement ou au moins partiellement bien résistants à la digestion.

Dans ce projet nous comparerons l'index glycémique de différentes formulations afin de tester la digestibilité cinq ingrédients contenant des fibres avec celui d'une dose équivalente de glucose. Pour cela des souris seront gavées avec chacune des solutions à tester et les variations de glycémie seront mesurées post administration.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 12 souris mâles C57Bl6J âgées de 8 semaines.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 Rs :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution *in vitro* pour étudier la réponse glycémique suite à l'absorption orale d'une solution glucidique. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'être humain.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes et chaque individu sera son propre témoin.

Raffinement : Aucune souffrance n'est attendue durant ce protocole, hormis lors des prélèvements sanguins. Afin de limiter la douleur engendrée, de la lidocaïne sera appliquée sur le bout de la queue avant incision. L'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de nid végétal. Afin de réduire le stress engendré par la procédure de gavage, les animaux seront habitués à ce geste pendant les jours précédant le premier test et les animaux seront manipulés fréquemment. Le comportement des animaux est observé tout au long de la procédure, du fait de la fréquence des prélèvements sanguins.

10753 Les maladies neuromusculaires sont des maladies pour la majeure partie génétique, qui touchent le muscle squelettique et/ou le système nerveux. Il existe plus de 200 maladies neuromusculaires différentes. Elles diffèrent entre elles par la sévérité, l'âge d'apparition des symptômes et les muscles atteints selon le gène muté. Au cours des dernières années, l'identification de cellules souches au sein de tissus adultes et la démonstration de leur contribution à la régénération tissulaire ont conduit à de nouvelles pistes thérapeutiques. Ainsi, la transplantation de populations progénitrices musculaires (cellules satellites ou myoblastes) est aujourd'hui une étape clé pour caractériser leur comportement *in vivo*, qu'il s'agisse de cellules musculaires issues d'un sujet sain ou atteint d'une maladie neuromusculaire. Pour certaines maladies neuromusculaires cette transplantation représente également une étape clé pour envisager le traitement de certaines maladies neuromusculaires. Nous nous intéressons aux cavéolinopathies musculaires, maladies rares dues à des mutations sur le gène qui code la cavéoline 3 (CAV-3), une protéine localisée à la face interne de la membrane plasmique musculaire au niveau d'invaginations appelées cavéoles.

Ce projet consiste à étudier le comportement *in vivo* de cellules souches musculaires humaines (myoblastes humains) isolées à partir du muscle squelettique humain d'un sujet atteint de cavéolinopathie. Ces myoblastes sont caractérisés par une mutation dans le gène qui code pour la cavéoline 3 et seront comparés aux mêmes myoblastes humains où la forme sauvage de la protéine a été restaurée. On étudiera la capacité de ces cellules à participer à la régénération musculaire. Le choix d'un modèle de souris immunodéficiente est indispensable puisqu'il s'agit de tester des cellules humaines. Pour cela le muscle Tibialis Anterior (TA) a été choisi comme muscle cible de l'injection. Quinze souris immunodéficientes seront utilisées dans cette étude. Afin de réduire le nombre de souris utilisées dans le respect de la règle des 3R, les deux TA de chaque souris seront injectés, réduisant ainsi le nombre des souris utilisées de moitié. Les souris seront anesthésiées par injection du mélange Kétamine/Xylazine. En post-opératoire les animaux recevront un analgésique (Buprenorphine). Suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de déceler d'éventuels signes de douleur. Les animaux qui montrent un quelconque signe de détérioration de leur santé seront euthanasiés.

10754 Les valeurs sanguines des ions doivent être maintenues à l'intérieur d'intervalles étroits, sous peine d'entraîner des désordres plus ou moins graves, parfois mortels. Le rôle principal du rein est de maintenir des valeurs dans des limites acceptables en contrôlant la quantité de chaque ion éliminé dans l'urine.

La protéine appelée vasorine a été identifiée dans l'urine de patients ayant des maladies rénales mais son rôle demeure inconnu. Dans le rein, elle est surtout exprimée dans le glomérule et la partie distale du tubule. La génération de souris dépourvues de la protéine vasorine a été peu informative, car ces souris meurent vers 21 jours de vie post-natale : à cet âge, les études physiologiques sont extrêmement difficiles et elles n'ont pas pu être conduites pour identifier la fonction de vasorine.

dans le tubule rénal. Afin de contourner cette difficulté, nous prévoyons de supprimer l'expression de la vasorine uniquement dans le tubule rénal et à l'âge adulte, en utilisant un modèle d'inactivation conditionnelle de cette protéine.

Les objectifs sont

- d'identifier les anomalies sanguines et urinaires provoquées par la perte de la protéine vasorine dans le tubule rénal chez la souris adulte

- de mesurer les conséquences de la perte d'expression de vasorine sur la capacité des segments tubulaires rénaux à réabsorber les ions *ex vivo*

- d'étudier l'évolution de la fonction rénale au cours de la vie des animaux

La règle des 3R a été appliquée du mieux possible lors de l'élaboration du protocole d'étude. Toutes les procédures le nécessitant seront réalisées sous anesthésie. Le nombre d'animaux par groupe a été calculé en tenant compte de la variabilité des paramètres d'intérêt en fonction des conditions expérimentales. Dans la mesure du possible, en fonction des contraintes des procédures, les animaux bénéficient d'un environnement enrichi et leur souffrance est prise en compte et atténuée au maximum.

Au cours du protocole, les animaux sont observés tous les jours et pesés 2 fois par semaine avec une attention particulière aux points limites définis préalablement pour l'étude. Les mesures réalisées tiennent compte de l'état de l'animal de manière à avoir la meilleure performance des mesures réalisées (raffinement) et réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés (réduction). Cent cinquante souris (100 témoins et 50 souris ayant une inactivation de la vasorine dans le tubule rénal) sont utilisées dans cette étude.

Il n'y a pas d'alternative à cette étude, les modèles cellulaires existant ne permettant pas de rendre compte de la complexité du fonctionnement du tissu rénal intact.

10755 Notre équipe s'intéresse aux rôles de la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) neurotransmetteur du système nerveux central. Ce neurotransmetteur est associé à de nombreuses pathologies psychiatriques, anxiété, dépression, suicide, troubles psychotiques et bipolaires. Ces troubles psychiatriques sont souvent associés à des anomalies du sommeil. Nos études utilisent plus spécifiquement comme outil un des 15 récepteurs cibles de ce neurotransmetteur, le récepteur 5-HT_{2B}. Nous avons montré qu'une mutation de ce récepteur chez l'homme, était associée à une impulsivité excessive, des comportements psychotiques et une tendance accrue au suicide. Le but de nos travaux actuels est donc de valider ces données chez la souris afin de comprendre plus en détail les fonctions cérébrales contrôlées par ce récepteur et ainsi d'en comprendre les pathologies associées, impulsivité, ou comportement psychotique en relation avec les processus inflammatoires. Nous prévoyons de valider les phénotypes observés après l'élimination de l'expression totale à ceux consécutifs à une invalidation locale de ce récepteur 5-HT_{2B}, soit dans les neurones qui produisent la sérotonine, soit les macrophages résidents du cerveau, ou cellules microgliales. Ces souris mutantes sont analysées dans une série de tests comportementaux afin d'évaluer les modifications comportementales éventuelles induites après élimination locale de ces récepteurs, en particulier sur la régulation du sommeil et de la mémoire. Seules les souris génétiquement modifiées permettent d'étudier le rôle de gènes particuliers dans la physiopathologie des troubles psychiatriques et des anomalies du sommeil qui les accompagnent. À l'heure actuelle, de nombreux aspects des troubles du sommeil et de la mémoire ont pu être modélisés chez le rongeur. Le nombre d'animaux mis en jeu lors de nos expériences de tests comportementaux (672). En application de la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement), nous avons réduit ce nombre au strict minimum nécessaire à atteindre la puissance statistique requise. Afin de restreindre encore la quantité, les animaux sont utilisés pour une série consécutive de plusieurs de test lorsque l'impact d'un premier test n'intervient pas sur les tests subséquents. De plus notre stratégie expérimentale permet de ne soumettre chaque lot d'animaux qu'à une seule privation de sommeil. Les observations du bien-être sont réalisées 1 fois/jour. En cas de douleur manifeste (dégradation de l'état de la fourrure, manque de toilettage, manque d'intérêt pour la nourriture,

posture anormale ou blessure persistant 3 jours), les animaux sont euthanasiés par l'expérimentation après discussion avec le chef de projet.

10756 CONTEXTE : l'infarctus du myocarde reste l'une des principales causes de décès chaque année dans le monde. L'étude de sa physiopathologie et des mécanismes pouvant aboutir à la protection du tissu cardiaque est donc une priorité afin d'obtenir des thérapeutiques efficaces. Durant l'infarctus du myocarde, il est largement décrit qu'un statut inflammatoire s'installe dans le tissu et une meilleure compréhension des différentes phases inflammatoires pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de traitement.

Le but de ce projet est d'évaluer l'impact de différentes protéines connues et impliquées dans la régulation de l'inflammation sur la pathologie d'intérêt du laboratoire, l'infarctus du myocarde.

Trois protéines centrales de l'inflammation systémiques ont été sélectionnées pour cette étude : Caspase 1 (Casp1), Caspase 11 (Casp 11) et NLRP3. Afin de mener à bien ces investigations, l'expérimentation animale est nécessaire puisque cette étude nécessite l'analyse au niveau de l'organe entier l'impact de la régulation de l'inflammation. Nous disposerons de souris Knock out pour ces protéines ainsi que de leurs contrôles wild type. Six groupes expérimentaux composeront l'étude. En premier lieu, une séquence d'ischémie-reperfusion *in vivo* sera réalisée. La ligature de l'artère principale du cœur (coronaire) implique une chirurgie lourde, sous anesthésie générale. Il s'agit cependant du modèle de référence pour l'étude *in vivo* et préclinique de l'infarctus du myocarde. La chirurgie consiste à placer l'animal sous respirateur, puis une thoracotomie est réalisée afin de pouvoir ligaturer l'artère et donc de réaliser la séquence d'ischémie puis de reperfusion en permettant le retour du flux sanguin par le retrait de la ligature. Une suture des plaies suivi d'une surveillance de l'animal sur plusieurs jours est ensuite mis en place.

Néanmoins, cet acte chirurgical précis est parfaitement maîtrisé par les chirurgiens animaliers du laboratoire et fait l'objet d'une analgésie et d'un suivi post-opératoire adaptés.

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

Dans le but d'améliorer le bien-être des animaux et ce, dès leur arrivée dans notre animalerie, un enrichissement de milieu est mis en place et renouvelé très régulièrement avant l'expérimentation ainsi qu'en soins post-opératoires. Afin de supprimer la souffrance et la douleur, l'acte chirurgical d'ischémie-reperfusion est réalisé sous anesthésie générale avec prémédication analgésique et anesthésique local. En soins post-opératoires, nourriture et boisson sous forme gélifiées seront mises à disposition de l'animal en plus de la nourriture et boisson habituelle, les groupes sociaux seront conservés et un protocole analgésique continu sera mis en place. Ceci dans le but de limiter la souffrance potentielle de l'animal durant la phase post-opératoire. Une fiche de suivi de chaque animal est rédigée quotidiennement afin de surveiller le comportement et la santé de l'animal pour ajuster les soins et l'analgésie apportés à l'animal, ou encore pour mettre fin au protocole. Le nombre d'animaux pour cette étude a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables, à savoir 72 animaux au total.

10757 La rétine est un ensemble de cellules hautement spécialisées qui est responsable de notre vision, elle est parcourue par un réseau de petits vaisseaux sanguins. L'atteinte de l'intégrité de ces vaisseaux sanguins est une caractéristique commune à plusieurs pathologies de la rétine qui peuvent conduire à la cécité si elles ne sont pas traitées, comme la rétinopathie diabétique, la forme humide de la DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge), les occlusions veineuses, la myopie. Dans ces maladies, les parois des vaisseaux ne sont plus étanches, elles laissent passer des fluides et des molécules qui détériorent les tissus avoisinants, les petits vaisseaux peuvent aussi se dilater, créer de petites poches de sang qui peuvent se rompre entraînant un saignement. En réponse à la dégradation de l'état des petits vaisseaux, se met en place une néovascularisation : de nouveaux vaisseaux qui poussent de façon anarchique, peu fonctionnels avec des parois peu étanches, ce

qui aggrave d'autant plus les maladies. Il est donc très important de soigner ces atteintes vasculaires de l'œil pour protéger la rétine et récupérer un maximum d'acuité visuelle chez les patients.

L'objectif du projet est la mise en place, au sein de l'établissement utilisateur, d'un modèle expérimental de néovascularisation rétinienne chronique chez le lapin et le rongeur afin de tester l'efficacité de traitements potentiels dans cette maladie. Nous nous baserons sur les données de la littérature, en utilisant un composé qui induit les mécanismes similaires à ceux impliqués dans les complications néovasculaires chez l'homme.

Ce projet nécessitera au maximum sur 5 ans 2280 rats, 2280 souris, 2280 lapins adultes. Afin de respecter la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux par groupe est limité pour cependant rester adapté à l'analyse des résultats par tests statistiques afin de permettre de conclure sur l'efficacité ou non d'un traitement. Des évaluations non invasives de la pathologie sont utilisées tout au long de l'étude pour éviter l'euthanasie l'animal.

- Raffinement : un suivi quotidien des animaux sera effectué afin minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettent de limiter une éventuelle douleur à son minimum. Les animaux sont hébergés dans des cages contenant un enrichissement adapté à l'espèce pour améliorer le bien-être de l'animal. Les examens non invasifs pour évaluer la pathologie sont semblables à ceux pratiqués chez l'homme en cabinet ophtalmologique ou en cabinet vétérinaire. Les examens de l'œil qui requièrent un immobilisme de l'animal pourront être réalisés sous anesthésie pour son confort. Ce projet a été soumis pour évaluation à un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

-Remplacement : à ce jour, aucune méthode alternative ne permet de mimer l'œil dans son environnement et dans sa globalité fonctionnelle. En effet, l'œil est composé de différents tissus de physiologie différente soumis aux variations environnementales, aux interactions des tissus et organes voisins. Le projet nécessitera donc d'avoir recours à des animaux compte tenu des particularités de l'organe concerné par le projet et l'absence de méthode alternative.

10758 Ce projet a pour objectif d'initier chaque année 50 étudiants de deuxième année de formation technique et professionnelle aux procédures expérimentales permettant de tester les effets toxiques et écotoxiques des molécules chimiques. Pour cela nous avons décidé de réaliser un test de toxicité tel que décrit dans les directives de l'OCDE (essai n° 414 : « Test de tératogénicité d'une substance »). Ce test fait partie d'une batterie de tests visant à s'assurer de l'innocuité d'une substance sur le développement de l'embryon et du fœtus au cours de la gestation ou de la grossesse. Néanmoins, afin de réduire le nombre d'animaux pour ce projet, une seule espèce sera utilisée, le rat de souche Sprague Dawley (contre deux dans les directives émanant de l'OCDE), et un seul lot de 25 individus sera constitué (contre cinq dans les directives émanant de l'OCDE). Afin d'être certains de disposer de 25 femelles gestantes au moment des séances de TP, 30 individus seront achetés au fournisseur pour un total de 150 animaux sur 5 ans. Les femelles non gestantes seront mises à disposition d'autres procédures autorisées au sein de notre structure d'enseignement. La substance testée sera une molécule modèle, un colorant utilisé en histocytologie, connue pour avoir des effets sur le développement embryonnaire mais aucun effet manifeste chez la mère à la dose utilisée (50mg/kg). Les résultats obtenus par les étudiants seront comparés à un lot témoin simulé informatiquement là encore pour respecter le principe des 3R (réduction). Outre la mise en place des différentes procédures (coupes anatomiques, colorations spécifiques, observations anatomiques) nécessaires à l'acquisition des données permettant la réalisation du test proprement dit, ce travail permettra aux étudiants de mettre en œuvre des techniques zootechniques de base (contrôle du cycle des femelles et des accouplements, suivi quotidien et entretien des animaux) et de Bonne Pratique de Laboratoire enseignées par ailleurs. De plus, les données générées lors de ce travail pratique seront utilisées pour évaluer les connaissances en analyse de données acquises par les étudiants au cours de leur formation.

10759 Les anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) représentent une cause importante de morbi-mortalité chez les sujets âgés de 65 à 85 ans et un coût socio-économique conséquent. La physiopathologie des AAA est encore méconnue. Sans traitement chirurgical, le devenir de l'AAA chez l'homme est la rupture de la paroi aortique. Des études chez l'homme et la souris ont montré que les mastocytes, des cellules connues pour leur rôle délétère dans les allergies, sont présents en plus grand nombre dans les aortes malades. Les mastocytes pourraient notamment participer à la rupture des anévrismes, ou au contraire participer à leur cicatrisation. Cependant, les études chez l'homme et les modèles animaux existant ne permettent pas de déterminer avec certitude si et comment les mastocytes participent à la progression des AAA.

Nous allons développer par croisement un nouveau modèle de souris transgénique, dans lesquels il est possible d'induire des anévrismes par infusion d'angiotensine, et dans lesquelles il est possible de supprimer les mastocytes de façon inductible par l'injection d'une drogue. La comparaison des souris déplétées en mastocytes à différents stades de développement des AAA ou non déplétées nous permettra de comprendre le rôle des mastocytes dans le développement et la progression des AAA.

Ceci, en parallèle à des études sur des échantillons humains, pourrait conduire à de nouveaux traitements (ciblant les mastocytes) visant à diminuer le risque de rupture chez les patients avec AAA.

Ce projet respecte la règle des 3R. Le développement des AAA est un processus complexe faisant intervenir de nombreux types cellulaires, et l'étude de l'impact des mastocytes sur les AAA ne peut donc se faire que sur des organismes vivants, ayant un système immunitaire proche de l'homme, comme les souris, et ne permet pas le remplacement par des études *in vitro*. Pour l'ensemble des expériences, nous prévoyons d'utiliser 100 souris, pour une durée de 2 ans. Le fonds génétique des souris est contrôlé et homogène. Les souris contrôles proviennent des mêmes croisements que les souris mutées. Enfin, une étude statistique pour le calcul du nombre de sujets nécessaires a été réalisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux et éviter toute souffrance inutile : calcul de la taille de l'échantillon avec le logiciel JMP pour une puissance de 20% pour les expériences d'AAA et de 80% pour les tests de déplétion et un risque alpha de 5%, en prenant en compte des données précédentes de la littérature et du laboratoire. Ces facteurs vont réduire fortement la variabilité expérimentale et donc le nombre d'animaux nécessaires. Afin de respecter le principe de raffinement, les animaux seront observés tous les jours par les membres qualifiés de l'animalerie et tout comportement anormal sera directement communiqué à la personne responsable du projet. De plus, les animaux seront observés régulièrement (au moins 1 fois par semaine) par les expérimentateurs confirmés responsables du projet connaissant bien les modèles utilisés. Enfin, les animaux sont maintenus sans isolement, avec enrichissement. Les procédures le nécessitant sont réalisées sous anesthésie, et les souris sont alors placées sous une lampe chauffante jusqu'à leur réveil.

10760 CONTEXTE

Les métastases hépatiques de cancers colorectaux représentent un problème majeur de santé publique. Le seul traitement à visée curative est la chirurgie de résection mais la majorité des patients (entre 70 et 80%) ne sont pas éligibles. Parmi les contre-indications à la chirurgie, l'atteinte de la zone nommée confluent cavo-sus-hépatique reste actuellement sans aucune solution valide. Des études ont montré que le contact entre une métastase et un vaisseau de gros calibre engendre un taux d'échec plus élevé avec les techniques de destruction tumorale actuellement disponibles (comme la radiofréquence et la cryothérapie) en raison d'une dispersion calorifique du traitement par le flux sanguin.

Les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) représentent une technique de destruction tumorale efficace et peu dépendante de la perfusion sanguine. La destruction tissulaire par HIFU apparaît donc très indiquée pour traiter la zone de confluent.

La sonde HIFU qui sera mise en œuvre est actuellement utilisée en clinique pour traiter des métastases dans d'autres zones du foie. La technique n'est pas dépendante du flux sanguin pour

les vaisseaux inférieurs à 5 mm de diamètre mais il n'existe pas de données sur les structures vasculaires majeures du foie. Le but de cette étude est donc de préciser l'indication d'un traitement par HIFU au niveau du confluent cavo-sus-hépatique.

OBJECTIFS

1- Evaluer la faisabilité de lésions HIFU au niveau du confluent cavo-sus-hépatique avec la sonde destinée à la thérapie hépatique peropératoire et ajuster éventuellement les conditions d'expositions ultrasonores.

2- Etudier les lésions ultrasonores obtenues du point de vue échographique, macroscopique et microscopique dans un délai de 7 jours après la réalisation des lésions.

3- Déterminer s'il est possible de traiter par HIFU, sans risque particulier, à proximité du confluent cavo-sus-hépatique.

TYPE DE PROJET/PROCEDURES/ESPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

Ce projet de recherche translationnelle d'une durée maximale de 2 ans mettra en œuvre un maximum de 6 porcs. Une procédure classée sévère consistera à opérer l'animal sous anesthésie générale, d'appliquer le traitement par HIFU dans la région cavo-sus-hépatique puis à suivre l'animal pendant 7 jours. Enfin l'animal sera euthanasié et autopsié pour rechercher des complications et prélever le foie et les organes environnants pour analyse histologique.

CONFORMITE AVEC LES 3R :

Réduction : 6 animaux est le strict minimum nécessaire pour évaluer la sécurité et la tolérance du traitement envisagé

Raffinement : A leur arrivée, les animaux bénéficient d'au moins 6 jours d'acclimatation. Des enrichissements sont mis en place tout au long de l'hébergement et les animaux seront conditionnés à être manipulés afin de réduire le stress au moment de l'intervention. Le jour de la chirurgie, l'animal sera prémédiqué et transporté sous sédation, avant de réaliser une anesthésie générale par intubation. La procédure chirurgicale est réalisée sous conditions strictes de stérilité et effectuée par un chirurgien expérimenté. Les animaux sont observés au moins 2 fois par jour. Le protocole d'analgésie est administré par application d'un patch.

Remplacement : Des travaux préalables ont été réalisés ex-vivo et en modélisation afin de valider la technique mais il est à présent nécessaire de pouvoir valider la procédure chirurgicale de traitement sur animaux vivants avant de pouvoir passer en clinique.

10761 Le Gb3 (Globotriaosylcéramide) est une molécule fortement et spécifiquement exprimée en surface des cellules de certains cancers, notamment lorsque les tumeurs résistent aux chimiothérapies. Le but de ce projet est de montrer qu'en ciblant Gb3, il est possible de détruire spécifiquement, à l'aide du système immunitaire, les cellules cancéreuses tout en limitant les effets toxiques pour le patient ainsi que les mécanismes de résistance des thérapies. Nous souhaitons donc évaluer l'effet d'un anticorps ciblant Gb3 sur la croissance des tumeurs en vue d'applications pour le patient atteint de cancer.

Nous avons montré que notre anticorps reconnaît Gb3 en surface des cellules cancéreuses en culture et induit leur mort par intervention du complément, composé du système immunitaire.

Une étude bibliographique nous a permis de constater que le système du complément est peu efficace chez la souris. Nous avons donc testé l'efficacité du système de toxicité par le complément dans différentes espèces animales à partir de prélèvement de sérum de cochon d'Inde, rat, souris et humain. Il apparaît que ce système du complément, peu efficace chez la souris (quelle que soit la souche) fonctionne chez le rat. Une autre équipe dont l'anticorps est utilisé en clinique, a également montré que leur anticorps efficace chez le rat ne fonctionne pas du tout chez la souris. Nous avons choisi le modèle du rat nude car il ne présente aucune anomalie du système immunitaire inné (présence de cellules NK, macrophages, du complément et des cellules présentatrices d'antigène) tout en permettant l'implantation de tumeurs humaines. Ces 2 caractéristiques sont très importantes pour étudier l'effet anti-tumoral des anticorps monoclonaux.

Nous utiliserons deux types de tumeurs : un lymphome de Burkitt et un modèle de cancer de l'ovaire OV-1 pour lequel nous avons obtenu *in vitro*, un clone résistant à la doxorubicine (OV1-DXR).

Nous souhaitons donc dans un premier temps évaluer le potentiel thérapeutique de notre anti-Gb3 seul sur la croissance des tumeurs dans notre modèle de lymphome. En fonction des résultats, nous réaliserons les expérimentations avec le modèle de cancer de l'ovaire.

Les anticorps monoclonaux nécessitent différents acteurs du système immunitaire. La cascade cellulaire et moléculaire activée au niveau du système immunitaire n'est pas modélisable *in vitro* ou *in silico*. Nous ne pouvons répondre à la question posée par ce projet sans l'utilisation d'animaux.

De manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire et d'éviter toute forme de souffrance à l'aide de complément alimentaire et de traitement antidouleur adaptés. Toutes les interventions et administrations se feront sous anesthésie générale ou locale. Les points limites établis seront strictement appliqués.

Afin de limiter le nombre d'animaux, les tumeurs vont être greffées sur chaque flanc de la souris pour que le matériel biologique soit suffisant pour être ensuite implanté sur le rat.

Une étude de la croissance tumorale sur un petit nombre de rats permettra d'évaluer la pertinence de notre étude et de définir le nombre d'animaux utilisés dans le test d'efficacité. L'étude se fera en plusieurs étapes. Si la tumeur ne pousse pas sur le rat, le projet sera arrêté. Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à une étude statistique permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus. Les techniques de greffe ont été standardisées pour améliorer la reproductibilité des résultats. Toutes les greffes et procédures seront faites sous anesthésie. Les animaux bénéficieront d'un enrichissement adapté avec eau et nourriture *ad libitum*. Un traitement antidouleur type AINS sera administré en cas d'apparition de signes douloureux.

Nous utiliserons un total de 10 souris et de 219 rats.

10762 Le but principal de ce projet est d'étudier si un régime riche en graisses (High Fat Diet ou HFD) produit une addiction à la nourriture en utilisant un modèle de prise de nourriture compulsive que nous avons développé chez le rat. En effet, il est admis que la prise chronique d'une nourriture riche en graisses produit des changements dans le cerveau et dans le comportement qui peut amener à une véritable incapacité de contrôler la recherche et la prise de nourriture. Nous avons récemment mis en place au laboratoire une procédure comportementale opérante qui permet de mesurer la résistance à la punition et ainsi la compulsivité vis-à-vis de la prise de nourriture. Nous mènerons notre recherche chez des rats mâles et femelles avec une exposition au régime riche en graisses à l'adolescence et à l'âge adulte pour vérifier si le sexe et/ou l'âge sont des facteurs de risque pour développer ce comportement pathologique. Enfin, nous mesurerons si ce comportement persiste ou disparaît après un arrêt de plusieurs semaines du régime alimentaire riche en graisses.

Ces expériences se déroulent en 3 phases différentes.

La phase 1 correspond à l'exposition chronique à la nourriture riche en graisses de 7-8 semaines pour induire une addiction.

La phase 2 correspond à la phase d'arrêt du régime riche en graisses qui sera soit de 0 (non arrêt) ou 21 jours.

La phase 3 correspond à l'auto-administration de nourriture que l'on associe ou non avec une punition d'intensité croissante, représentée sous forme d'émission d'un choc électrique au niveau plantaire.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'une maladie psychiatrique telle que l'addiction, peut uniquement être menée sur un animal vivant (remplacer). Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés par des méthodes expérimentales validées et reproductibles. Et nous utiliserons des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA qui nous permettront de faire des comparaisons multiples et de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduire). Les animaux seront hébergés avec du matériel d'enrichissement. Nos procédures nécessitent une manipulation

journalière des animaux (5 jours sur 7) qui permettra à l'expérimentateur d'observer et d'évaluer l'état de santé de l'animal ainsi que son évolution dans le temps. Le weekend un suivi du bon état général de l'animal est assuré par un chercheur ou le personnel zootechnicien de l'animalerie. Tous écarts à la normalité seront répertoriés et des solutions pour pallier à cette situation seront considérées. (Raffiner). Nous avons calculé que pour cette étude 448 rats seront nécessaires pour obtenir des données qui soient analysables statistiquement.

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

10763 La rétine est la partie de l'œil essentielle pour la vision. Les maladies de la rétine, ou rétinopathies sont souvent liées à des phénomènes de croissance anormale des vaisseaux sanguins, parmi ces maladies on compte notamment la rétinopathie du prématuré, la forme proliférative de la rétinopathie diabétique, ou la forme humide de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Ces maladies peuvent rapidement devenir invalidantes si elles ne sont pas traitées. Ces vaisseaux anormaux entraînant des lésions des tissus avoisinant, un des moyens d'agir est de stopper la croissance vasculaire anarchique.

L'objectif du projet est la mise en place d'un modèle expérimental de rétinopathie induit par exposition à l'oxygène chez le rongeur, reproduisant la croissance anormale de vaisseaux au niveau de la rétine, afin de contribuer au développement de nouveaux traitements médicaux visant à diminuer les signes cliniques et améliorer la vision des patients.

Ce projet nécessitera au maximum sur 5 ans, 1560 souris, 2170 rats.

Afin de respecter la règle des 3R :

Réduction :

- Les informations bibliographiques recueillies, les analyses statistiques ainsi que notre expérience, nous permettront de limiter au maximum le nombre d'animaux pour cependant rester adapté à l'analyse des résultats par tests statistiques.
- Des évaluations non invasives de la pathologie sont utilisées tout au long de l'étude pour éviter l'euthanasie de l'animal.

Raffinement :

- Un suivi quotidien des animaux est effectué afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux.
- Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettent de limiter une éventuelle douleur à son minimum.
- Les animaux sont hébergés, en groupe dans des cages contenant un enrichissement adapté à l'espèce pour améliorer le bien-être de l'animal.
- Les examens pour évaluer la pathologie sont semblables à ceux pratiqués chez l'homme en cabinet ophtalmologique ou chez l'animal en cabinet vétérinaire.
- Contention douce par un personnel formé à la manipulation des souris et des rats, et, selon les examens, ils seront pratiqués sous sédation pour éviter le stress de l'animal.
- Ce projet a été soumis pour évaluation à un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

Remplacement :

- A ce jour, aucune méthode alternative ne permet de mimer l'œil dans son environnement et dans sa globalité fonctionnelle. En effet, l'œil est composé de différents tissus de physiologie différente soumis aux variations environnementales, aux interactions des tissus et organes voisins. Le projet nécessitera donc d'avoir recours à des animaux compte tenu des particularités de l'organe concerné par le projet et l'absence de méthode alternative.

10764 L'inflammation est un mécanisme de réaction de l'organisme suite à une agression. Les différentes parties de l'œil peuvent être le siège d'inflammation en réponse à un traumatisme, une chirurgie intra oculaire, une maladie auto immune, une maladie inflammatoire, une infection virale ou bactérienne. Une des conséquences de l'inflammation est l'augmentation de la perméabilité vasculaire : les parois des petits vaisseaux sanguins constituent une barrière entre le sang qui circule à l'intérieur et les tissus qu'ils parcourent. Lors du phénomène d'inflammation cette barrière est rompue laissant passer des substances du sang vers des tissus avoisinant et perturbant les équilibres physiologiques. Au niveau de la partie antérieure de l'œil, la barrière hémato-aqueuse contrôle l'intégrité de l'humeur aqueuse. Ce liquide transparent remplit le segment antérieur de l'œil, la partie qui comprend la cornée, tissu transparent avant de l'œil, l'iris coloré entouré du corps ciliaire en périphérie et le cristallin. Il a un rôle nourricier et d'épuration pour les tissus avec lesquels il entre en contact. Lors d'inflammation l'humeur aqueuse se charge en protéine, se trouble, et ne peut plus assurer ses fonctions. Il en résulte des dysfonctionnements qui peuvent altérer l'acuité visuelle à plus ou moins loin terme si l'inflammation n'est pas traitée efficacement.

Les inflammations qui touchent les différentes parties de l'œil sont appelées uvéites, selon la Société Française d'Ophtalmologie, dans les pays occidentaux l'incidence des uvéites serait de 17 à 52 nouveaux cas par 100 000 habitants par an, plus élevée en Inde 700 cas pour 100 000 habitants. Les uvéites seraient également la cinquième cause la plus fréquente de perte de vision.

Notre but est de développer un modèle expérimental d'inflammation de la chambre antérieure avec rupture de la barrière hémato-aqueuse chez le lapin afin de tester l'action de substances thérapeutiques. Nous nous baserons sur des données de travaux publiés dans la littérature scientifique. Ce projet nécessitera au maximum 2250 lapins sur 5 ans. Afin de respecter la règle des 3R :

Réduction :

-Le nombre d'animaux par groupe est réduit à son minimum pour cependant rester adapté à l'analyse des résultats par tests statistiques.

-Des évaluations non invasives de la pathologie sont utilisées tout au long de l'étude pour éviter l'euthanasie de l'animal.

Raffinement :

-Un suivi quotidien des animaux est effectué afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux.

-Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettent de limiter une éventuelle douleur à son minimum.

-Les animaux sont hébergés dans des cages contenant un enrichissement adapté à l'espèce pour améliorer le bien-être de l'animal.

-Les examens pour évaluer la pathologie sont semblables à ceux pratiqués chez l'homme en cabinet ophtalmologique ou chez l'animal en cabinet vétérinaire.

-Contention douce par un personnel formé à la manipulation des lapins.

-Ce projet a été soumis pour évaluation à un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

Remplacement : à ce jour, aucune méthode alternative ne permet de mimer l'œil dans son environnement et dans sa globalité fonctionnelle. En effet, l'œil est composé de différents tissus de physiologie différente soumis aux variations environnementales, aux interactions des tissus et organes voisins. Le projet nécessitera donc d'avoir recours à des animaux compte tenu des particularités de l'organe concerné par le projet et l'absence de méthode alternative

10765 Le cancer est à l'heure actuelle un enjeu de santé publique mondiale. L'incidence des nouveaux cas de cancers dans le monde est estimée à 14,1 millions de personnes et le taux de mortalité associé est porté à 8,1 millions de personnes. Les pays développés sont particulièrement touchés par ce fléau, ils comptabilisent environ 64% des décès liés au cancer dans le monde. Parmi les différentes stratégies actuellement en développement pour lutter contre ce fléau, la vaccination anti-

tumorale apparaît comme prometteuse. Cette dernière, permet de stimuler ou de renforcer l'action naturelle du système immunitaire de l'organisme afin de lutter contre le cancer. Dans ce contexte, ce projet de pharmacologie s'inscrit dans une phase de développement préclinique de différents vaccins destinés à lutter contre les différentes formes de cancer. Il aura pour but de valider le mécanisme d'action et l'activité anti-tumorale de plusieurs candidats vaccins. Néanmoins, il n'est actuellement pas envisageable d'administrer un nouveau vaccin aux patients (cancéreux) sans qu'il ait été préalablement testé et évalué (efficacité, toxicité, etc...) chez l'animal. Ainsi, l'évaluation de l'efficacité anti-tumorale de nos vaccins sera réalisée dans des modèles expérimentaux tels que la souris. Il est important de noter que l'expérimentation animale sera utilisée de manière rationnelle et selon les réglementations en vigueur qui garantissent un traitement éthique de l'animal de laboratoire. De plus, les agents thérapeutiques utilisés au cours de ce projet ayant déjà montré leur innocuité chez la souris et l'Homme, aucun dommage majeur / effet secondaire n'est attendu dans le cadre de nos études. Les animaux seront suivis de manière régulière par le personnel. Des points limites sont définis pour retirer l'animal du projet si nécessaire.

D'une part ces études, nous permettront d'obtenir l'accord de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) pour évaluer l'efficacité de nos candidats vaccins dans des phases cliniques sur des patients atteints de cancers. D'autre part, elles seront constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché « AMM ». En effet, ces futurs vaccins devront répondre à des normes internationales de qualité scientifique et clinique qui seront étroitement évaluées par les autorités de santé pour la délivrance de l'AMM.

Ce projet s'échelonnait sur 5 ans, avec un nombre d'animaux de 7200 souris. Conscients du nombre élevé d'animaux prévus pour ce projet, nous allons tous les ans, réévaluer et réduire autant que possible le nombre d'animaux à utiliser en fonction des résultats. En effet, un screening *in vitro* puis *in vivo* chez l'animal nous permettra de réduire le nombre de candidats vaccins. Le but étant au fur et à mesure d'éliminer les vaccins les moins pertinents afin d'aller au bout du projet avec un nombre restreint de candidats vaccins. Cette réévaluation annuelle nous permettra ainsi de réduire le nombre de souris prévu initialement.

10766 L'intégrité intestinale est associée à une altération du métabolisme et de la signalisation immunitaire et, de manière critique, est un signe avant-coureur très précoce de la mort. Ses découvertes suggèrent que le dysfonctionnement de la barrière intestinale peut être un facteur important dans la physiopathologie du vieillissement. Les stratégies classiques d'étude du vieillissement reposent sur une vision continue des processus impliqués. Un modèle de vieillissement en deux phases a été développé. Il repose sur la modification de la perméabilité intestinale qui augmente avec l'âge des individus. La phase 1 est caractérisée par une perméabilité intestinale normale et une grande espérance de vie. La phase 2 est caractérisée par une forte perméabilité intestinale et une faible espérance de vie. Découvert initialement chez la Drosophile, ce modèle a ensuite été étendu à d'autres organismes modèles : *C. elegans*, *D. rerio* et *N. furzeri*. Ce modèle permet d'établir de nouvelles approches afin d'étudier le vieillissement en le séparant en deux phases distinctes pouvant être analysées indépendamment et permettant ainsi d'identifier des caractéristiques du vieillissement précédemment masqué. Par exemple, des protéines détectées uniquement chez les individus en phase 2 ont été identifiées et leur inhibition en phase 1 ont entraîné une augmentation significative de la durée de vie. Ainsi, certains changements survenant au cours de la phase 2 de la vie peuvent être contrecarrés au cours de la phase 1 afin d'améliorer la longévité des individus. L'extension de ce modèle de vieillissement aux mammifères aura un impact considérable sur la perception du vieillissement dans la population humaine ainsi que sur la façon dont il est traité. En effet, une meilleure capacité de prédiction du risque de survenue de la mort chez un individu permettra de mieux suivre les individus les plus à risque pour en comprendre l'origine et éventuellement réduire ce risque. L'application du modèle d'étude développé chez de multiples organismes modèles aux mammifères permettra de développer une compréhension plus profonde des mécanismes à l'œuvre dans la mort liée au vieillissement.

Le but du projet est donc de transférer le modèle de la Drosophile vers la Souris afin de (1) mettre en évidence les phase 1 et 2 du vieillissement chez un mammifère couramment utiliser en

physiologie, (2) d'étendre les découvertes faites chez la drosophile pour permettre des interventions génétiques et pharmacologiques chez les mammifères, (3) de permettre une meilleure compréhension des changements métaboliques précoces associés au vieillissement chez l'humain pour mieux suivre les individus à risque et réduire ce risque. Le but est de prolonger la phase 1 chez l'humain avant l'apparition de maladies critiques liées au vieillissement qui apparaissent en phase 2.

Afin de réaliser ce projet des souris (*Mus musculus*) seront utilisées. Sur ces animaux 2 tests expérimentaux seront effectués : (1) Test de perméabilité intestinale et (2) Mesures métaboliques. La perméabilité intestinale des souris sera évaluée par un gavage avec des Dextrans de poids moléculaires différents couplés à des protéines fluorescentes. La quantité de Dextrans fluorescents retrouvés dans le sang reflètera la perméabilité intestinale des individus. Les animaux seront regroupés en sous-groupes en fonction de leur perméabilité intestinale. Chaque groupe sera caractérisé métaboliquement (consommation d'oxygène et de dioxyde de carbone, prise alimentaire, prise hydrique et activité locomotrice) afin de corréliser perméabilité intestinale et métabolisme. Ces deux procédures seront réalisées à des temps bien définis au cours du vieillissement. La procédure (1) de mesure de perméabilité intestinale est la méthode non invasive standardisée chez la souris qui a déjà été publiée à de nombreuses reprises (les Dextrans sont utilisés en clinique chez l'homme et ne sont pas toxique pour la souris). La procédure (2) de mesure métabolique est une méthode non invasive déjà approuvée par le comité d'éthique local.

Cette étude ne peut être remplacé par d'autres moyen car le projet porte sur le vieillissement d'un organisme entier. Ce modèle a déjà été caractérisé chez 4 espèces différentes, la souris est le modèle mammifère le plus approprié. En effet, les systèmes métaboliques et physiologiques de la souris sont suffisamment proches de l'homme pour servir de base à l'évaluation de futurs traitements. De plus le projet cherche à caractériser le vieillissement de l'organisme entier, ce projet ne peut donc pas être remplacé par des approches *ex vivo*. Le minimum de souris nécessaire à valider le modèle sera utilisé tout en respectant le bien-être animal et la règle des 3 R. Les procédures seront raffinées pour réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. Les animaux sont surveillés régulièrement avec évaluation de leur aspect physique, de leur comportement, de leur posture, de leur prise alimentaire, de leur température corporelle et de leur poids. Les souris seront gardées jusqu'à leur mort naturelle dans un milieu enrichi avec des nids végétaux et des cylindres en cartons. Dans tous les cas les animaux seront euthanasiés avant de présenter un état clinique dégradé.

Au cours de ce projet de 5 ans, 200 souris seront utilisées (2 lignées de souris, mâles et femelles, 50 individus par groupe expérimentale).

10767 Ce projet consiste à tester une nouvelle approche d'immunothérapie dans le contrôle du développement d'une tumeur ovarienne chez la souris. Un maximum de 310 souris sera utilisé afin d'établir l'efficacité d'un composé X sur l'inhibition du développement tumoral. Pour cela, des cellules d'une lignée murine de cancer ovarien seront injectées par voie intrapéritonéale à la souris et, après installation et développement de la tumeur, les souris seront traitées par injection du candidat X.

Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 310 souris dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Une approche *in vitro* a été développée en amont afin de valider notre hypothèse de travail et l'utilisation du composé X sur des cellules immunitaires impliquées dans le contrôle de la tumeur mais cela ne reproduit pas un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie.

- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature et l'expérience des différents partenaires de ce projet.

- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Les animaux sont suivis quotidiennement et pesés 2 fois par semaine. Certains signes cliniques prédictifs d'une infection

importante, conduiront à la mise à mort des animaux sans délai afin de leur éviter toute souffrance. Tout type de médication pouvant interférer avec la réponse immunitaire et/ou l'action du composé X est proscrite.

10768 Le Streptocoque du groupe B (SGB) est une bactérie appartenant à la flore vaginale et digestive, présente chez 15 à 30% des individus. Inoffensif chez l'adulte en bonne santé, le SGB est la première cause d'infection bactérienne néonatale dans le monde industrialisé. La bactérie infecte les poumons ou colonise le tube digestif avant d'atteindre la circulation sanguine (bactériémie) puis les méninges dans 20 à 50% des cas. Les infections néonatales à SGB, bien que rares (300 cas par an en France), sont grevées d'une mortalité importante et fréquemment associées à de lourdes séquelles neurologiques.

Ce projet s'intéresse à la compréhension de la virulence particulière du SGB chez le nouveau-né et en particulier à l'impact des hormones maternelles dans le franchissement de la barrière intestinale, dans la survie de la bactérie dans le sang, et dans la survenue de la méningite. En effet, le fœtus est exposé tout au long de la grossesse à des concentrations élevées d'hormones maternelles et en est massivement imprégné à la naissance et jusqu'à trois mois de vie.

Les modèles *in vitro* ne peuvent restituer ni la complexité des barrières physiologiques, ni l'intégralité du processus infectieux allant de la colonisation digestive jusqu'à la méningite, ni les interactions bactéries-hôte mises en jeu lors de l'infection. Ainsi, seule l'expérience chez l'animal permettra de déterminer l'impact des concentrations hormonales sur la virulence bactérienne et sur les différentes étapes du processus infectieux. La souris est un modèle animal pertinent et validé pour l'étude des infections à SGB et l'animal de choix pour étudier le franchissement de la barrière intestinale et la survenue de la méningite après infection par le SGB, ceci dans des modèles d'imprégnation hormonale mimant les concentrations hormonales d'un nouveau-né. Les souris seront mises à mort dans un délai de 48h après infection pour prélèvements d'organes afin de dénombrer les bactéries et étudier la réponse immunitaire. Le nombre de souris utilisées sera de 1026 sur 4 ans.

Les expérimentations se déclineront via trois procédures. La première est un préalable aux procédures 2 et 3 et n'induit pas de stress particulier. Elle consistera à injecter les cocktails hormonaux aux animaux pour mimer l'imprégnation hormonale du nouveau-né. La deuxième et la troisième consisteront à infecter les animaux soumis à la première procédure par le SGB pour étudier le rôle des hormones dans les infections. La deuxième procédure consistera donc en une infection par voie orale qui permettra d'étudier le franchissement de la barrière intestinale, et la troisième procédure en une infection par voie intraveineuse pour étudier la survie de la bactérie dans le sang et la survenue de la méningite. Selon ces deux dernières procédures, les animaux sont mis à mort au maximum 48h après l'infection, et de manière anticipée en cas de détection de signes anormaux de douleur ou de stress qui reflètent la sévérité de la méningite. Ces procédures ne seront pas associées à l'administration d'antalgiques ou d'anti-inflammatoires car cela pourrait modifier le comportement des animaux et la détection de signes de souffrance et modifier la réponse immunitaire qui sera également étudiée. Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum en homogénéisant strictement les conditions expérimentales. Les modèles *in vitro* ne peuvent pas restituer la complexité des barrières physiologiques, les interactions intercellulaires et l'impact des concentrations hormonales sur l'ensemble des systèmes mis en jeu lors de l'infection à SGB. Ainsi, seule l'expérience chez l'animal permettra de définir si les hormones stéroïdiennes influencent l'infection à SGB. Enfin, les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi avec maisonnette en carton et coton compacté. Ils seront observés quotidiennement pour détecter tout signe anormal de douleur, de souffrance ou de stress et nous avons raffiné la méthodologie par l'introduction de points-limites entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Les résultats obtenus grâce à ce projet contribueront à mieux définir les interactions bactéries-hôte au cours de l'infection à SGB et à identifier les mécanismes responsables de l'association étroite entre cette bactérie et le nouveau-né.

10769 Contexte

1. Santé publique. Le risque de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires est en augmentation dans les populations occidentales et dans le monde entier. Cette augmentation est favorisée par les régimes pléthoriques et déséquilibrés (excès d'apport en acides gras saturés, en saccharose, consommation d'alcool, insuffisance de l'apport en fibres, etc...). Elle pourrait s'expliquer en partie par une altération précoce des fonctions intestinales (fonction barrière, microbiote) qui aurait des répercussions sur l'ensemble de l'organisme.

2. Environnement et durabilité des systèmes alimentaires. Il y a actuellement, une forte demande sociétale pour des protéines végétales en alternative aux protéines animales. Cette demande correspond à des exigences de durabilité (respect de l'environnement) et parfois d'éthique (respect de l'animal d'élevage) dans un contexte d'accroissement de la population humaine mondiale dans les prochaines décennies.

La question de la qualité protéique des protéines végétales par comparaison à celle des protéines animales dans un contexte de régime déséquilibré est donc une vraie question scientifique avec des implications fortes en termes de choix des sources protéiques par rapport aux différentes filières de production et de transformations.

Objectif et procédures.

L'objectif de cette étude est de tester, sur un modèle nutritionnel validé chez le rat, l'effet du remplacement des protéines animales par des protéines végétales sur les facteurs de risque de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires induits par un régime déséquilibré analogue à celui consommé par une grande partie de la population.

Pour ce faire, deux études seront menées chez le rat.

Une pré-étude menée sur 20 rats, permettra de valider un régime d'induction de perturbations asymptomatiques des fonctions intestinales entraînant une augmentation des facteurs de risque. Si cette pré-étude permet d'obtenir les effets délétères recherchés en réponse au régime d'induction il sera décidé de poursuivre le projet par des études précliniques de prévention nutritionnelle sur un plus grand nombre de rats afin d'étudier les effets potentiellement favorables du remplacement des protéines animales du régime d'induction par divers mélanges de protéines végétales (3 études en tout au maximum, 40 rats dans chaque étude, donc 120 rats).

Le nombre total de rats utilisés dans ce projet sera au maximum de 140.

Conformité avec les exigences en matière de remplacement, de réduction et de remplacement.

S'agissant d'une étude pré-clinique, il n'y pas de remplacement possible au vu des critères retenus (mesures de consommation alimentaire spontanée, prélèvements de sang et de tissus). L'effectif des animaux pour chaque phase repose sur les données de la littérature concernant la sensibilité de certaines mesures *ex vivo* de physiologie intestinale et sur notre expérience concernant les facteurs de risque cardiométabolique chez le rat. Le découpage du projet en deux phases, répond aux exigences de réduction et de raffinement. La phase préalable permettra d'initier ou pas la phase suivante et d'ajuster les conditions des études d'intervention nutritionnelle en termes d'effectif, en recalculant les tests de puissance statistique afin de réduire si possible le nombre de rats dans chaque groupe.

L'hébergement en cage individuelle et sur grille est rendu nécessaire par les mesures de consommation alimentaire et de digestibilité. Une semaine d'adaptation est prévue à cet effet. Pour pallier cet isolement social, les cages ont des parois transparentes permettant aux rats de voir leurs congénères, sachant par ailleurs que le dispositif permet les échanges olfactifs et auditifs. Le milieu sera enrichi au moyen d'objets, tels que des tunnels en plastique leur permettant de se soustraire à la vue de leur entourage et de plates-formes leur évitant le contexte permanent avec la grille.

10770 Le Trouble de Déficit d'Attention avec ou sans Hyperactivité (TDAH) est une maladie très hétérogène qui touche 3 à 5% des enfants en âge scolaire et perdure dans 60% des cas à l'âge adulte. Les patients atteints présentent des difficultés à maintenir une attention soutenue, une impulsivité et de l'hyperactivité. Une étude d'imagerie réalisée dans un modèle de rat de TDAH

suggère que des anomalies de fonctionnement de régions impliquées dans la motivation joueraient un rôle clé dans la maladie.

L'objectif de ce projet est d'étudier la motivation de ces animaux et de voir si la manipulation de la motivation peut permettre d'améliorer la réalisation de tâches de flexibilité mentale qui sont déficitaires dans ce modèle et chez les patients.

Ces expériences se dérouleront sur 5 semaines comprenant une phase d'habituation, une phase de mesure de la motivation, une phase d'apprentissage et enfin une phase de test pour évaluer la flexibilité comportementale (changement de comportement face à un changement de contexte).

Dans ce projet nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche visant à comprendre les bases d'une maladie neuropsychiatrique telle que le TDAH, peut uniquement être menée sur un animal vivant (remplacer). Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés par des méthodes expérimentales validées et reproductibles. Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés pour pouvoir réaliser les tests statistiques appropriés (réduire). L'effectif de 60 rats (témoins inclus) est nécessaire pour obtenir des données qui soient analysables statistiquement. Ces procédures opérantes ne comportent pas de douleur ou de stress particulier. Les animaux seront hébergés par deux en présence d'un enrichissement (raffiner).

10771 Le Diplôme Universitaire de Technologie spécialité Génie Biologique Option Analyses Biologiques et Biochimiques est une formation professionnalisante qui a pour objectif de former des techniciens supérieurs avec un large spectre de compétences technologiques en biologie dans des secteurs variés : biomédical et pharmaceutique. Cette formation est cadrée par un programme pédagogique national consultable sur le site Legifrance, mentionnant l'acquisition de compétences en pharmacologie expérimentale *in vivo*. Les études neuropharmacologiques comportementale permettent de caractériser les modes d'actions des substances psychotropes sur le comportement et elles sont incontournables pour caractériser leurs effets désirés (anxiolyse, antidépressive...) et indésirables (sédation, addiction...). L'acquisition de compétences en neuropharmacologie comportementale implique des approches pédagogiques variées (cours théoriques, travaux dirigés, vidéos...) et également des séances de travaux pratiques (TP). Au cours des TP, les étudiants apprennent à évaluer les effets de substances neuroactives chez un modèle animal standard, la souris, en utilisant des tests comportementaux validés dans le domaine pharmaceutique. L'objectif de ces TP sera l'acquisition de compétences techniques concernant l'emploi des principaux tests comportementaux utilisés dans l'évaluation des effets d'agents psychotropes administrés par voie orale (anxiolytique, antidépresseur...). Les tests comportementaux consistent en l'emploi de petits dispositifs permettant d'étudier différents comportements spontanés (en relation avec l'anxiété ou la peur ou la dépression), les performances motrices et cognitives. Toutes les procédures utilisées peuvent être considérées comme légères.

Pour réduire le nombre d'animaux à son minimum et permettre des analyses statistiques non paramétriques (Tests de Mann et Withney et de Kruskal-Wallis) exploitables, nous avons calculé qu'il était nécessaire d'utiliser des lots de 6 souris par série de tests, soient 144 souris pour une promotion de 48 étudiants par année universitaire (720 souris pour 5 ans). La promotion est organisée en 4 groupes, de 6 binômes chacun. Chaque binôme évaluera les effets d'un traitement par un psychotrope (tranquillisant ou antidépresseur ou psychostimulant) administré par voie orale à un lot de 6 souris qui leur sera confié pendant 3 semaines. Ceci reproduit un traitement d'environ 2 semaines. Ces TP se feront dans le respect de la règle des 3 R de manière à assurer une Réduction des animaux utilisés, le Raffinement des techniques opératoires d'euthanasie. Les animaux seront hébergés dans des cages aux normes suivant l'âge et le poids des animaux. Les cages seront enrichies par des jouets (rouleau de carton, copeaux). Les animaux seront surveillés quotidiennement par le personnel de l'animalerie et le poids est suivi 2 fois par semaine par les étudiants. Le comité du bien-être de l'animalerie sera consulté lors du déroulement des séances. En ce qui concerne, le Remplacement, même si les vidéos et les travaux dirigés sont des approches pédagogiques importantes dans l'acquisition des compétences techniques dans ce domaine, il reste nécessaire de compléter leur apprentissage au travers de TP.

10772 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la 1^{ère} cause de handicap acquis et la 3^{ème} cause de mortalité chez l'adulte en France. Actuellement le seul traitement approuvé en cas d'ischémie suite à un AVC est l'injection d'une molécule qui permet de dissoudre le caillot obstruant l'artère. Cependant pour bénéficier de cette thérapie la fenêtre d'intervention n'est que de 4.5 heures suite aux premiers symptômes, réduisant considérablement le nombre de patient pouvant être traité. Il est à noter que ce traitement est associé à un risque élevé d'œdème et de complications hémorragiques au cerveau. D'autre part, il n'existe actuellement aucun traitement à distance de l'AVC (+ de 24 heures). Dans le but de proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour contrecarrer les effets délétères de l'AVC (inflammation, apoptose, cicatrice gliale, etc), nous proposons d'utiliser les propriétés des cellules souches mésenchymateuses et des lipoprotéines HDL (High Density Lipoproteins) suite à un AVC ischémique. Les cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux sont des cellules multipotentes faciles à prélever. Elles sécrètent des facteurs de croissance et des molécules anti-inflammatoires qui agissent sur le développement et la protection des cellules environnantes. Ces cellules ont également des effets positifs sur la réduction de l'apoptose, la promotion de la croissance axonale et le remodelage synaptique ainsi que l'activation de la neurogenèse et l'angiogenèse. Les HDL sont principalement connus pour leur rôle de transport retour du cholestérol vers le foie expliquant leur rôle protecteur dans les maladies cardiovasculaires. Mais, elles possèdent également des effets pléiotropes anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-protéases et anti-thrombotiques qui protègent les cellules endothéliales au cours d'une agression. L'objectif de ce projet est d'étudier les effets de l'injection intracérébrale à l'aide d'un appareil de stéréotaxie de cellules souches issus du tissu adipeux ou de HDL directement au niveau du cerveau suite à une ischémie cérébrale induite chez la souris. Le modèle expérimental d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne au monofilament permet de reproduire le phénomène d'ischémie/reperfusion chez la souris avec un contrôle au niveau du temps d'occlusion de l'artère. Les fonctions motrices et sensorielles des souris seront évaluées sur une période de 4 semaines afin d'observer les effets de l'injection des cellules souches et des HDL sur la récupération fonctionnelle post- AVC. L'utilisation du modèle d'ischémie transitoire chez la souris par insertion d'un monofilament est couramment utilisé dans les études sur les accidents vasculaires cérébraux et permet de mimer les lésions subies par le cerveau. Il présente également l'avantage de reproduire *in vivo* les déficits neurologiques (perte neuronale, inflammation, cicatrice gliale) et comportementaux (déficits sensoriels et moteurs) observés chez les patients ayant subi un AVC. Durant les procédures chirurgicales, les animaux seront maintenus anesthésiés sous isoflurane et maintenu à une température constante sur un plateau chauffant afin d'avoir un état d'inconscience de qualité et de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse. Nous possédons l'expertise et l'expérience de ce modèle d'ischémie cérébrale chez la souris ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaire pour l'expérimentation. Nous utiliserons un maximum de 80 souris C57/BL6 et les procédures expérimentales seront réalisées dans le respect des 3R.

10773 Nous cherchons à caractériser la biodiversité des petits mammifères non-volant vivant sous et dans les habitations traditionnelles des Amérindiens Wayana, en Guyane française.

Pour ce faire, nous échantillonnerons auprès de diverses maisons des hameaux de Taluen et de Twenké (commune de Maripasoula) les petits mammifères non-volants (rongeurs et opossums). L'effort de piégeage durera de 3 à 4 jours par habitation, et nous avons obtenu des autorisations des habitants d'une dizaine de maisons. Le nombre total d'animaux utilisés sera compris entre 10 et 100 individus durant toute la durée du projet.

La stratégie d'observation (piégeages dans les maisons) sera conduite afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées.

Les animaux seront capturés par des pièges-cages contenant une abondante litière ainsi que de la nourriture ad-libitum ; Les pièges sont grands (cages-ratières) et contiennent de la nourriture en abondance et du coton

Thermiquement isolant. Ces cages seront vérifiées matin et soir pour diminuer au mieux leur inconfort, les animaux seront euthanasiés après anesthésie profonde, mesurés, disséqués, et seront préservés pour de futures analyses morphologiques. Des tissus et du sang seront prélevés

et préservés pour les études de virologie, de parasitologie (vers endoparasites) et de systématique moléculaire. Les méthodes d'échantillonnage seront semblables à celles déjà utilisées ailleurs en Guyane, notamment dans les hameaux des Amérindiens Wayampi de Trois-Sauts.

- 10774** "La plasticité corticale dépendante de l'expérience serait assurée par le renforcement des connexions (synapses) entre neurones, appelé potentialisation à long-terme (LTP). Malgré son rôle critique dans le fonctionnement du cerveau (apprentissage, mémorisation), les mécanismes de la LTP *in vivo* restent largement inconnus, en raison de fortes limitations technologiques. Notre projet de recherche fondamental permettra de mettre à jour les mécanismes cellulaires de l'apprentissage et de la mémorisation, et donc de comprendre leurs altérations qui interviennent chez l'Homme au cours de pathologies psychiatriques. Pour répondre à cette question essentielle, nous proposons :
- De d'identifier le rôle de des voies de signalisation moléculaire au cours de la LTP évoquée par la stimulation des moustaches dans le cortex somatosensoriel de rongeurs vivants.
 - De définir la relation entre la dynamique moléculaire, la LTP et la plasticité corticale après un changement des entrées sensorielles chez l'animal vivant.

Les expérimentations décrites seront conduites sur des animaux vivants anesthésiés dans le plus strict respect de la règle des 3R et lois éthiques en vigueur. 1) Remplacer : Le projet repose sur l'idée de mettre en évidence les mécanismes de plasticité en réponse à un stimulus physiologique environnemental et dans le cadre d'une perte des expériences sensorielles. Par définition, le projet ne peut alors se faire que sur des animaux vivants. La souris sera utilisée comme modèle car les propriétés du néocortex sont similaires à celui des autres mammifères, y compris les humains. Les résultats pourront donc être directement transférés à l'Homme. 2) Réduire : Nous utiliserons au maximum une centaine de souris chaque année (soit exactement 520 souris). La solidité de nos hypothèses de travail (vérifiée par des expériences pilotes confirmant la possibilité d'induire de la plasticité cellulaire *in vivo*), la nature innovante des méthodes utilisées (l'imagerie chronique permet de diviser le nombre d'animaux par deux car chaque animal est son propre contrôle), ainsi que la qualité de la mise en œuvre des procédures (compétences en chirurgie de l'expérimentateur validés par les enseignements pratiques de la formation de spécialisation en chirurgie, utilisation de tests statistiques pairés avec une puissance >0.8 , plan expérimental précis, suivi stricte de la formation,..) permettra de contrôler voire de réduire le nombre des animaux nécessaire. 3) Raffiner : les douleurs liées aux chirurgies seront scrupuleusement contrôlées et soulagées par des molécules anesthésiques et antalgiques efficaces, dans le plus strict respect des points limites généraux et spécifiques définis en annexe. Les souris seront maintenues en groupes sociaux. Afin d'encourager l'exploration, les cages seront enrichies avec des tunnels et des nids. Des critères de bien être seront évalués quotidiennement."

- 10775** De nos jours, l'hyperthermie d'un tissu tumoral a été reconnue comme traitement du cancer, en synergie avec une chimiothérapie ou une radiothérapie. En effet, il a été montré qu'une élévation de la température locale des tumeurs entraînait une diminution de la croissance du cancer à des températures supérieures à 42°C, alors que les tissus sains pouvaient tolérer ces températures élevées. L'hyperthermie peut être induite par l'application d'un champ radiofréquence (RF) externe aux patients. L'avantage de cette méthode est sa non-invasivité, mais ce chauffage ne peut pas être localisé. Dans le but d'améliorer la précision du chauffage, l'hyperthermie peut s'accompagner d'une incorporation de particules d'oxydes de fer superparamagnétiques dans le tissu tumoral. Ces particules peuvent détruire les cellules cancéreuses en chauffant localement sous l'action d'un champ magnétique radiofréquence. De plus, ces particules sont d'excellents agents de contraste pour l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Le succès récent de l'hyperthermie magnétique dans le traitement anti-cancéreux est très prometteur, mais la méthode nécessite d'être améliorée, autant au niveau de la synthèse des particules de fer, de leur distribution au sein de la tumeur, ou du suivi de la température par IRM. Afin de continuer les avancées sur la thermo-ablation par radiofréquence, notre projet consiste à étudier le mécanisme d'action de différentes particules superparamagnétiques, internalisées dans des cellules tumorales et soumises à un champ magnétique radiofréquence. Une approche biologique sera mise en place à la fois *in vitro* pour

étudier l'internalisation des particules superparamagnétiques et *in vivo* sur le petit animal pour vérifier leur efficacité thérapeutique.

Plus précisément, il s'agit d'appliquer un champ radiofréquence sur des modèles de tumeurs primaires du cerveau et de métastases cérébrales chez la souris. L'efficacité thérapeutique de l'hyperthermie magnétique sera suivie par IRM (détection de la distribution des particules au sein de la tumeur, suivi du volume tumoral, détection de nécrose). La formation de la tumeur nécessitera l'injection de cellules tumorales ayant internalisées ou non différentes particules superparamagnétiques (de 1µm à 20nm de diamètre).

Le nombre total d'animaux envisagé pour les expérimentations est de 216 souris pour 2 ans. Seulement 8 animaux par groupe seront utilisés. Il est indispensable d'utiliser les animaux vivants, car nous souhaitons détecter l'apparition ou pas d'une tumeur, évaluer quelles particules induit la meilleure efficacité thérapeutique, évaluer quand l'hyperthermie magnétique est la plus efficace au cours de la croissance tumorale et ensuite suivre l'évolution tumorale pour voir si les vitesses de croissance sont différentes. Des groupes seront soumis à la RF (à différents temps au cours de la croissance tumorale, de façon unique ou répétée). Un groupe ne subira pas de traitement par RF. Deux autres groupes comprendront des souris injectées seulement avec du milieu de culture et ou seulement avec des particules de fer pour vérifier (i) la non-toxicité de l'application d'un champ RF sur un cerveau sain ainsi que (ii) la validité des diagnostics IRM. Les animaux seront gardés dans des cages contenant des bâtonnets de bois à ronger, matériaux de construction de nid, coton, maisonnette, tubes en carton, de la paille, de la nourriture et de l'eau à volonté. Si certains animaux entrent en état de souffrance, ils pourront être séparés et placés dans des cages individuelles. De plus, l'administration d'un analgésique sera envisagée. L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement.

10776 Le cancer colorectal (CCR) est une tumeur maligne du côlon ou du rectum. Le CCR est le 3e cancer le plus fréquent en France et le 2e en termes de mortalité. La France est l'un des pays d'Europe où l'incidence du CCR est la plus élevée pour les deux sexes. Les cancers colorectaux sont sporadiques dans 80 % des cas, surviennent dans un contexte familial dans 15 % des cas et sont liés à une prédisposition génétique dans 5 % des cas.

La flore intestinale, composée de très nombreuses espèces de bactéries et appelée « microbiote », intervient à de très nombreux niveaux dans l'organisme. Aujourd'hui considéré comme un organe à part entière, le microbiote facilite la digestion, contribue à la biosynthèse des vitamines, régule notre système immunitaire mais participe aussi au contrôle de nos émotions et de notre cerveau. De nombreuses études récentes suggèrent l'implication du microbiote intestinal dans le développement du CCR.

Streptococcus gallolyticus sous espèce *gallolyticus* (Sgg), autrefois dénommée *Streptococcus bovis* biotype I, est une bactérie de la flore intestinale qui constitue une cause émergente de septicémies et d'endocardites chez les personnes âgées. Depuis plus de 50 ans, les études épidémiologiques indiquent l'existence d'une forte association entre les infections invasives à *S. gallolyticus* et le CCR. De plus, une étude publiée l'année dernière par une équipe américaine indique un rôle causal direct de *S. gallolyticus* dans le développement du CCR. Presque simultanément, une autre équipe a montré que cette bactérie est aussi capable de profiter de l'environnement tumoral pour se multiplier au détriment d'autres bactéries présentes dans le microbiote de souris comme *Enterococcus faecalis*.

L'objectif principal de ce projet de recherche est de mieux comprendre le rôle de *S. gallolyticus* dans les CCR. Pour atteindre nos objectifs nous utiliserons trois modèles murins de CCR (un modèle chimiquement induit par un agent mutagène et deux modèles transgéniques) sur lesquels nous testerons l'impact de la colonisation intestinale par les différentes souches de *S. gallolyticus* sur le développement et la progression des tumeurs.

Le bénéfice attendu du projet est de déterminer si *S. gallolyticus* peut accélérer le développement du cancer colorectal et dans quelles conditions afin de préconiser des pistes d'intervention

thérapeutique et aussi de diagnostic précoce fondé sur la présence de bactéries à risque dans le microbiote (analyses des selles).

Les animaux utilisés dans ce projet seront des souris adultes mâles et femelles. Le nombre maximum d'animaux sera de 1540. Ce nombre a été calculé avec l'aide d'un biostatisticien afin de nous assurer d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé.

Pour atteindre nos objectifs nous allons mettre en œuvre 6 procédures expérimentales d'un niveau de sévérité légère (n=2) ou modérée (n=4).

Nous cherchons à déterminer expérimentalement si *S. gallolyticus* peut contribuer au développement du cancer colorectal dans un modèle murin. Il sera donc important de veiller constamment à la santé de nos animaux dès l'apparition des premiers symptômes de la maladie. Nous irons les observer chaque jour de la semaine dès que les tumeurs commenceront à apparaître (ce laps de temps sera différent selon le modèle expérimental utilisé). Si l'avancement du cancer du côlon induit une perte de poids supérieure ou égale à 20% du poids initial, ou si les signes comme diarrhées ou absence de fèces sont observés, la mise à mort des animaux sera effectuée sans attendre la fin de l'expérimentation envisagée. Le seul moment susceptible de provoquer un stress est l'inoculation par gavage des souches bactériennes. Pour limiter ce stress, nous utiliserons des sondes de gavage souples.

Seul le recours à l'animal peut permettre d'établir un lien causal entre la présence de *S. gallolyticus* dans le tractus intestinal et le cancer colorectal. Nous envisageons de suivre les effets des changements du microbiote intestinal sur une période assez longue chez l'animal pour pouvoir observer l'impact potentiel sur l'induction ou l'accélération de la cancérogénèse. En parallèle de ces expériences conduites sur les animaux, des tests sur des cellules en culture vont aussi être réalisées pour répondre à certaines questions mais qui ne peuvent pas remplacer, ni reproduire la complexité du microenvironnement intestinal dans un modèle animal. Pour réduire le nombre des animaux, nous utiliserons et optimiserons la culture d'organoïdes du petit intestin pour lequel la complexité de la crypte intestinale a pu être récapitulée *ex vivo*.

10777 La brique élémentaire du muscle squelettique est la fibre musculaire, issue de la fusion de centaines de cellules spécialisées, les myoblastes. Ces fibres musculaires dites squelettiques s'associent entre elles par milliers afin de former les muscles squelettiques responsables de tous les mouvements volontaires. Dans chaque fibre musculaire, le positionnement des noyaux est finement régulé. Les noyaux sont régulièrement espacés le long des fibres musculaires où ils sont localisés à la périphérie. Cette organisation des noyaux dans les fibres est responsable de l'intégrité fonctionnelle d'un volume déterminé de fibre musculaire. Le défaut de positionnement précis des noyaux dans les fibres musculaires matures (agrégation et centralisation) a récemment émergé comme un potentiel facteur contribuant à certaines maladies musculaires : il est ainsi fortement corrélé à certaines myopathies et à des faiblesses musculaires. L'objectif de cette demande est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des domaines nucléaires dans les fibres musculaires et leur implication dans la fonctionnalité des muscles.

Procédures et Retombées attendues :

Un criblage a été réalisé sur un modèle de fibres musculaires formées *in vitro* afin d'identifier des protéines régulant la formation des domaines nucléaires dans les fibres. Cette approche a permis d'identifier un gène qui altère fortement la localisation nucléaire dans les fibres musculaires formées *in vitro*.

Des modèles de souris génétiquement modifiées permettant l'inhibition programmée de cette protéine spécifiquement dans les fibres musculaires ont été développés mais l'impact de l'absence de cette protéine d'intérêt doit encore être évalué.

Remplacement : Des expériences sur lignées cellulaires seront réalisées quand cela sera possible. Cependant le modèle murin reste l'unique moyen d'une part pour étudier fonctionnellement le muscle dans son entité et d'autre part pour évaluer l'impact des défauts d'expression d'une protéine d'intérêt sur le fonctionnement musculaire au niveau de l'organisme.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en permettant une exploitation statistique des résultats sans compromettre les objectifs fixés. Les animaux seront utilisés pour des études histologiques et de cultures cellulaires pour plusieurs analyses. Des prélèvements multiples seront réalisés après euthanasie sur le même individu pour des tests parallèles.

Raffinement : Un personnel qualifié s'assure du bien-être des animaux tout au long du protocole. Une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée pour s'assurer de la prise en compte de points limites adaptés au modèle étudié.

Nombre de souris : 360

10778 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'une série de composés pharmaceutiques en développement destinés à l'amélioration des troubles métaboliques, notamment l'obésité et le diabète de type II associé. L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ces composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et la régulation glycémique chez un modèle de souris obèses ob/ob. Elle permettra d'établir un premier screening des différents composés et d'identifier les molécules dont le développement est à prioriser sur la base de leur efficacité préclinique.

Le traitement sera administré par voie orale pendant 28 jours au cours desquels la prise alimentaire et le poids corporel seront mesurés quotidiennement (D1-D28). Des mesures de composition corporelle seront réalisées chez l'animal vigile avant (D-1) et à l'issue du traitement (D28) à l'aide d'un minispec LF90II (Bruker). Des prélèvements sanguins pour mesure de glycémie après 4 heures de mise à jeun seront pratiqués une fois par semaine au cours du traitement (D1, D8, D15 et D28). Un test de tolérance oral au glucose (OGTT) sera pratiqué à D21 après 8h de mise à jeun. A D28, après la mesure de composition corporelle, les animaux seront anesthésiés et un prélèvement sanguin sera pratiqué par ponction cardiaque. Après euthanasie, des prélèvements d'organes seront pratiqués pour analyses ultérieures (foie, tissu adipeux, coeur).

La présente étude couvre le screening de 20 composés en développement qui seront testés par lots de 5. Chaque lot inclura, outre les groupes traités par les composés à tester, un groupe témoin (traité au véhicule) et un contrôle positif (composé de référence de la même classe thérapeutique que les composés testés dans le lot), soit un total de 7 groupes. Chaque groupe d'animaux sera composé de 9 souris et donc chaque lot sera composé de 63 animaux (9*7groupes).

L'étude emploiera ainsi un total de $4 \times 9 \times 7 = 252$ souris ob/ob.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

- Raffinement : Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et les troubles métaboliques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages collectives (3 souris/cage) et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification.

Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté pour chaque série expérimentale en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et la régulation glycémique.

10779 De nombreux et nouveaux agents biologiques voire pathogènes sont découverts régulièrement dans le monde entier chaque année. L'intérêt de ce projet est de développer des outils de recherche

et de diagnostic afin de détecter et suivre ces agents en recherche médicale humaine et/ ou vétérinaire.

Nous avons besoin pour cela de produire des anticorps dirigés contre ces agents biologiques :

- Des anticorps polyclonaux après une immunisation effectuée soit chez la souris soit chez le lapin ou le cobaye. Le choix de l'espèce se fait en fonction de l'affinité et de la quantité souhaité ainsi que de l'agent biologique étudié.

- Des anticorps monoclonaux après immunisation de souris pour obtenir des clones à partir d'hybridomes spécifiques et pouvoir produire le même anticorps à partir de ces clones remis en culture afin de ne pas devoir utiliser de nouvelles souris.

Tout agent pathogène sera inactivé avant injection afin de préserver l'animal. Des adjuvants pourront être utilisés pour favoriser les réponses immunitaires.

Remplacer : A ce jour, seul l'utilisation d'animaux permet la production d'anticorps nécessaires aux différents tests de diagnostic utilisés de manière récurrente dans les services concernés.

Réduire : Un minimum d'animaux est utilisé pour de petites productions ou des recherches de nouveaux anticorps. Lorsqu'un anticorps correspond aux attentes des tests, un nombre minimum de souris est utilisé afin de produire des hybridomes et ne plus avoir à passer par l'animal. Chaque animal est son propre témoin : avant l'immunisation du sérum pré-immun est prélevé pour s'assurer de la réponse immunitaire attendue.

Nous évaluons nos besoins sur 5 ans pour la production d'anticorps polyclonaux : entre 48 à 72 souris par an, 5 à 10 lapins par an et 5 à 15 cobayes par an. Pour la production d'hybridomes : 5 souris minimum par production d'anticorps monoclonaux soit une cinquantaine de souris par an.

Au total nous aurions au maximum : 610 souris, 50 lapins et 75 cobayes sur 5 ans.

Raffiner : Chaque groupe (souris/ 2-5) ou animal (lapin ou cobaye) sera stabulé dans une cage dans un même portoir ou armoire ventilé durant la totalité de l'expérimentation. Chaque groupe ou animal sera suivi de manière quotidienne, un enrichissement approprié (en fonction de l'espèce) sera disposé dans chaque cage et une grille de Morton et Griffiths adaptée sera utilisée pour suivre les animaux immunisés. Tout signe de douleur et/ou souffrance entraînera l'arrêt de la procédure et les animaux seront euthanasiés par injection de surdosage de pentobarbital. Lors de procédures de prélèvements des anesthésies générales et/ou locales seront réalisées en fonction de l'animal.

10780 Le lipopolysaccharide classique, ou LPS, est un puissant stimulateur du système immunitaire. L'idée d'utiliser le lipopolysaccharide chez l'homme sur des pathologies provoquant un affaiblissement du système immunitaire est ancienne. Les études ont montré que la dose maximale tolérée chez l'homme, par voie intraveineuse, est de 4 ng/kg. Cependant à cette dose les effets secondaires sont considérables et très inconfortables pour le patient car l'injection induit une production soudaine et importante des facteurs inflammatoires, modifie la numération formule sanguine, les facteurs de coagulation et perturbe les bilans hépatiques et rénaux. Cette voie thérapeutique n'a pu être concrétisée.

Dernièrement, la mise au point de nouvelles formulations de lipopolysaccharide a relancé l'intérêt de la molécule en l'absence de toxicité *in vitro* et d'effets secondaires chez le rat, moins sensible. Le lapin est connu pour reproduire fidèlement les complications observées chez l'homme.

L'objectif de ce projet est dans premier temps de confirmer l'innocuité des nouvelles formulations de lipopolysaccharide à dose thérapeutique, puis de rechercher la dose maximale utilisable en vue d'une application à l'homme.

-Phase 1 : Etude pilote pour raffiner les points limites.

Cette étude portera sur un nombre limité de lapin dont un lapin contrôle, requis pour raffiner les points limites et valider le process avant de faire la phase 2.

Nous réaliserons des prélèvements sanguins et chaque lapin sera équipé d'un gilet avec un système d'enregistrement des paramètres physiologiques (Fréquence cardiaque, fréquence

respiratoire) et d'un transpondeur pour la température corporelle. Ces méthodes permettent d'éviter une chirurgie plus contraignante et de manipulations trop stressantes pour l'animal.

-Phase 2 : Recherche de la dose maximale utilisable.

Après avoir déterminé et raffiné les points limites lors de la phase 1, nous établirons la toxicité à la dose maximale.

Ce projet nécessite au total 30 lapins.

Ce projet répond aux principes des 3Rs :

-Réduction du nombre d'animaux : le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum mais permet de répondre aux exigences de la pharmacopée et d'établir une analyse statistique valide.

-Réduction de la douleur, souffrance et raffinement : la phase 1 est une étude pilote afin de déterminer les points limites et connaître les possibles effets des nouvelles formules à une dose minimale. Si à cette étape, nous mettons en évidence trop d'effets indésirables sur les nouvelles formulations, le projet sera stoppé. A cause du port d'un gilet de télémétrie, les lapins seront en cage individuelle avec de l'enrichissement (foin et bâtons à ronger) et la possibilité de se voir.

-Remplacement : l'étude de toxicité met en œuvre des mécanismes physiologiques complexes ne pouvant pas être reproduit en *in vitro*. Les études préliminaires *in vitro* permettent de se limiter aux formules les mieux tolérées et les plus prometteuses.

10781 Ce projet concerne un enseignement à l'utilisation de l'animal de laboratoire, dans le cadre d'une formation professionnelle diplômante à la recherche préclinique et clinique : au-delà des enseignements théoriques et dirigés, la réalisation en vraie grandeur d'une étude utilisant des animaux permet de confronter les étudiants à des éléments concrets relatifs à l'hébergement et à l'utilisation des animaux, en vérifiant leur attitude et leur technicité.

Les étudiants auront durant leur semestre de formation à concevoir une étude en fonction de la littérature, la planifier, la réaliser puis l'interpréter, en s'appuyant sur des référentiels reconnus. Les compétences acquises pendant la formation seront donc à la fois scientifiques (conception, réalisation et interprétation statistique d'une étude), opérationnels (gestion de projet et démarche qualité) et éthiques (respect du bien-être animal et de la démarche 3R).

Le thème de l'étude est choisi par l'équipe pédagogique chaque année, parmi 3 prévus par ce projet (effet d'un analgésique sur une colite induite par une molécule d'origine microbienne, comparaison de méthodes d'anesthésie ou d'analgésie, ou effet de médicaments psychoactifs sur le comportement), de façon à répondre à ces objectifs, mais aussi pour apporter une contribution à la démarche 3R de l'institution (communication sur les améliorations apportées, production de données exploitables par d'autres équipes de l'établissement ou de vidéos pour des enseignements qui n'utiliseront pas d'animaux.).

Les dommages subis par les animaux durant le projet sont mis en balance des objectifs pédagogiques recherchés :

- Les animaux sont hébergés selon les conditions recommandées pour l'espèce, en groupes, dans un environnement enrichi, et ils sont suivis quotidiennement par les étudiants, en accord avec le responsable du bien-être animal de l'établissement. Une phase d'acclimatation est prévue.

- Les étudiants pratiquent pendant une semaine un protocole d'administration de substances et d'exams cliniques et comportementaux, en fonction du thème. La gravité du protocole est classée légère ou modérée selon que les substances administrées peuvent provoquer ou non des troubles cliniques ; des points limites précoces seront appliqués en cas de souffrance.

- Les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude pour effectuer une autopsie, à la fois utile pour obtenir des données complémentaires et pour la formation des étudiants.

Les exigences de remplacement, réduction et raffinement correspondent aux éléments suivants :

- La souris a été choisie car les étudiants doivent acquérir une expérience pratique avec une des espèces mammifères utilisées dans les études précliniques. La lignée, le sexe et l'âge des animaux

sont choisis pour chaque thème de façon à minimiser l'impact clinique ; ce projet prévoit aussi d'utiliser des souris exclues d'autres projets en raison d'un génotype inadapté.

- Le nombre d'animaux est limité au maximum à 50 par étude (soit 250 souris au total pour les 5 ans d'enseignement prévues par ce projet) : ce nombre est calculé pour permettre une analyse statistique de 4 à 5 conditions expérimentales avec une puissance suffisante et pour permettre à tous les étudiants de se former sans solliciter excessivement chaque animal.

- Les techniques sont réalisées en respectant les recommandations adaptées aux études précliniques ; les modalités d'anesthésie et analgésie seront définies avec un vétérinaire de l'établissement. A noter que les étudiants auront suivi au préalable la formation théorique et pratique à la fonction de concepteur. L'équipe pédagogique ainsi que le personnel de l'animalerie encadreront ces travaux d'un point de vue scientifique et technique quotidiennement.

10782 Ce projet s'inscrit dans le cadre du développement de traitements pharmacologiques de la dysfonction érectile mis en œuvre dans le laboratoire. Les complications génito-urinaires, en particulier sexuelles, bien que moins connues aussi bien du grand public que de la communauté scientifique, sont parmi les complications les plus fréquentes des pathologies cardiovasculaires et métaboliques. Leur incidence peut atteindre 75% de la population diabétique. Ces troubles sexuels masculins engendrent des conséquences personnelles négatives, telles que frustration, soucis, souffrance psychologique et/ou l'évitement de l'intimité sexuelle ce qui occasionne une altération de la qualité de vie et des difficultés relationnelles dans le couple.

La dysfonction endothéliale est le mécanisme physiopathologique unissant les maladies cardiovasculaires et la dysfonction érectile (DE). S'y associe dans certaines maladies comme le diabète une neuropathie végétative.

Selon les recommandations de l'European Association of Urology, le traitement de première intention de la DE est l'usage à la demande ou au quotidien des inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5 (IPDE5). Cependant, chez les patients souffrant de pathologies cardiovasculaires et/ou métaboliques, la DE s'accompagne d'une résistance aux traitements thérapeutiques actuels préconisés et ainsi les non répondeurs aux IPDE5 sont nombreux, avec un taux d'échecs thérapeutiques de 37 à 56% dans la population multi-pathologique comparé à 20% dans la population générale.

En effet, l'érection résulte d'une activation de la production de l'oxyde nitrique (NO) menant à une augmentation des taux de cGMP (cyclic guanosine monophosphate) intracellulaires, puis une vasodilatation des artères pénéennes et une relaxation du muscle lisse du tissu érectile. Les IPDE5 permettent l'accumulation de cGMP rendant ainsi ce dernier plus disponible pour induire une relaxation et par conséquent une réponse érectile. L'efficacité des IPDE5 nécessite donc une synthèse suffisante de cGMP résultant de la libération de NO. Chez les patients souffrant de pathologies cardiovasculaires et/ou métaboliques, la biodisponibilité du NO est très réduite, responsable d'un défaut de synthèse de cGMP, menant ainsi à un défaut de réponse aux IPDE5.

Les traitements de deuxième ligne de la dysfonction érectile : la pompe à vide ou vacuum et les injections intracaverneuses de prostaglandine E1, sont plus contraignants. En cas d'échec des traitements de deuxième intention, l'implant pénien doit être discuté.

Dans ce contexte, il en résulte un besoin thérapeutique qui n'a, à ce jour, été que peu exploré. Il est nécessaire donc d'avoir une recherche préclinique intensive pour pouvoir sélectionner et évaluer l'efficacité de candidats médicaments pouvant présenter un intérêt dans le traitement de la DE associée à différentes pathologies cardio-vasculaires/métaboliques ou écarter le risque d'un effet secondaire des candidats médicaments en développement pour d'autres pathologies, si le mécanisme d'action de ces candidats est suspecté d'avoir un effet indésirable sur la fonction érectile.

La mise en œuvre d'un modèle expérimental validé est nécessaire à cette démarche. Reproduire le contrôle neurophysiologique et la commande périphérique des mécanismes de l'érection *in vitro* (remplacement) est impossible rendant ainsi indispensable l'utilisation d'un modèle intégré faisant appel à des animaux vivants. L'étude de la fonction érectile par stimulation électrique du nerf

caverneux chez le rat mâle adulte anesthésié permettra d'évaluer quantitativement l'effet de principes actifs sur la réponse érectile dans des conditions expérimentales standardisées. Un soulagement de la douleur (analgésique) est systématiquement pratiqué au cours de cette procédure expérimentale sans réveil avec une analgésie pré-opératoire et une analgésie locorégionale (raffinement). Un suivi de la pression artérielle permet de suivre l'état général des rats lors de l'évaluation de la fonction érectile pour une action rapide si la pression diastolique < 40 mmHg. Du fait des connaissances des modèles/procédures liés au projet et de l'expérience du personnel y participant, il est possible de réduire au minimum (réduction) le nombre d'animaux inclus dans un groupe traitement à n=12 pour réaliser des statistiques acceptables, soit un nombre total de n=900 animaux pour l'intégralité du projet sur 5 ans. Les rats sont hébergés par 2 animaux par cage lorsque c'est possible, afin de favoriser leur interaction sociale et réduire leur stress et un enrichissement de la litière adaptée à leur espèce (litière à base de frisure de papier pour nicher et bûchettes de peuplier à ronger) est mis en place de façon systématique (raffinement). Enfin, en cas de traitement au préalable à l'évaluation de la fonction érectile, un suivi quotidien de l'état général et du poids des animaux sera réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance. Pour compléter ces données, des analyses biochimiques, d'ARNm et histologiques pourront être réalisées *ex vivo* à partir de sang, recueil d'urine ou d'organes prélevés.

10783 L'objectif du projet consiste à étudier le développement des cellules lymphoïdes, ainsi que leurs fonctions dans l'homéostasie tissulaire et dans l'initiation et le maintien de la réponse immune contre des tumeurs et les bactéries.

D'une part, nous analyserons les mécanismes de développement permettant la génération des différents types de lymphocytes. Cette étude consistera à déterminer les signaux activateurs et inhibiteurs permettant la génération, le maintien et la régulation fonctionnelle de ces cellules. D'autre part, nous étudierons leurs rôles et leurs interactions au sein du système immunitaire lors de la réponse anti infectieuse et anti-tumorale.

La réponse immunitaire est un processus biologique complexe nécessitant les interactions spatiotemporelles entre cellules immunes et molécules dérivées de tissu. Son étude nécessite ainsi la création d'un modèle reproductible permettant de modéliser cette complexité et d'étudier le rôle de chaque acteur de la réponse immunitaire. L'identification des mécanismes de l'homéostasie et de la fonction des lymphocytes constitue une base fondamentale dans le développement de nouvelles immunothérapies.

Actuellement, aucun système *in vitro* n'est capable de modéliser l'ensemble des critères et contraintes associées à la réponse immunitaire. De ce fait, l'utilisation d'un modèle animal défini est inévitable dans notre recherche. Cependant, le raffinement des procédures expérimentales par l'utilisation de technologies de haute performance jumelées à des modèles expérimentaux avancés (par exemple, le ciblage génique conditionnel des bactéries bioluminescentes) améliore leur efficacité permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaire.

Dans le cadre de ce projet, nous utiliserons dans les 5 ans à venir 2885 souris (maximum) et 5 procédures de sévérité légère (3) et modérée (2). Le nombre de souris par expérience ou par groupe (ou le nombre de répétitions par expérience) sera ajusté lorsque les données obtenues seront statistiquement satisfaisantes. Nos projets antérieurs nous ont permis d'optimiser nos techniques et d'améliorer le suivi des animaux afin d'obtenir des résultats valides tout en limitant la souffrance animale (nombre de cellules à injecter, points de temps d'analyse adaptés, points limites adaptés, suivi régulier des souris).

10784 Les rayonnements ionisants sont à ce jour un outil incontournable de l'arsenal thérapeutique de la cancérologie. En France, chaque année, 60% des cancers sont traités par radiothérapie externe soit environ 180 000 patients. Les pratiques de radiothérapie en routine imposent l'optimisation des doses délivrées au volume tumoral cible de façon à obtenir la meilleure efficacité thérapeutique possible tout en réduisant « autant que possible » la dose délivrée au tissu sain environnant la tumeur et assurer ainsi la qualité du traitement. Malgré les nombreux progrès dans ce domaine, il est important de noter que la radiothérapie s'accompagne fréquemment d'effets secondaires en

raison de la présence de tissus normaux dans le champ d'irradiation. Certains de ces effets disparaissent spontanément alors que d'autres apparaissent de façon inéluctable. La toxicité radio-induite aux tissus sains est donc un facteur limitant dans l'escalade de dose pouvant être délivrée à la tumeur. Cependant, sa sévérité peut affecter la qualité de vie des survivants du cancer qui sont de plus en plus nombreux. Cinq ans après traitement, 5 à 10 % des patients développent encore des complications tardives plus ou moins sévères de leur radiothérapie, soit un nombre de patients estimé en France entre 9 000 et 18 000 par an. Bien que cette technique présente un niveau de sécurité élevé, les incidents et accidents de radiothérapie survenus ces 5 dernières années rappellent que la radiothérapie, si elle est insuffisamment maîtrisée, peut conduire à des conséquences graves pour la santé des patients.

L'objectif de cette étude sera de développer une stratégie thérapeutique innovante afin de traiter la cystite radique suite à l'application d'un protocole de radiothérapie. Cette étude vise particulièrement à apporter des preuves de concept précliniques de l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) pour le traitement de la cystite radique. Il est nécessaire d'utiliser un modèle intégré in vivo. De plus, l'effet de ces traitements, pour qu'ils soient pertinents, nécessitent leur interaction avec les différents compartiments comme le rein, condition retrouvée chez le modèle animal intégré. Après vérification de la qualité des CSM, des rats seront soumis à une irradiation locale au niveau de la vessie puis traités par injection de cellules souches (CSM). Les effets de l'irradiation seront suivis à long terme (jusqu'à 12 mois). La dose d'irradiation sera minimisée afin de limiter les effets secondaires sur l'animal. L'effet de la thérapie cellulaire sur les animaux irradiés sera ainsi comparé aux séquelles observées chez les animaux non traités.

Au total 705 rats seront nécessaires à l'aboutissement de ces expérimentations. Le nombre d'animaux est basé sur le nombre statistique d'animaux nécessaire par groupe et sur l'expérience du laboratoire sur les procédures d'irradiation. Les animaux seront suivis tout au long des procédures expérimentales afin de limiter toute souffrance ou douleur.

10785 Les souris génétiquement modifiées permettent la modélisation de certaines maladies humaines (cancer, diabète, maladies autoimmunes, immunodépression.). Elles sont indispensables en recherche fondamentale pour mieux comprendre les causes des maladies mais aussi en recherche préclinique afin de tester l'efficacité et la non toxicité de nouveaux traitements.

Les souris génétiquement modifiées sont porteuses d'une ou de plusieurs altérations génétiques et leur élevage nécessite la détermination de leur génotype à la naissance.

Pour cela il faut prélever de l'ADN sur les souriceaux et rechercher la présence ou non des altérations génétiques transmises par leurs parents.

Au moment de ce prélèvement d'ADN il est nécessaire de marquer les souriceaux afin de pouvoir corréliser leur génotype au N° d'identification de la souris.

Plusieurs méthodes existent pour obtenir un prélèvement de l'ADN des souriceaux (Biopsie du bout de la queue ou d'une phalange, entaille à l'oreille, prélèvement de sang). Les méthodes pour identifier les souriceaux sont l'implantation d'un transpondeur, un tatouage, une bague à l'oreille. Le choix des méthodes utilisées dépend de l'âge de l'animal et des contraintes expérimentales.

Deux méthodes sont particulièrement intéressantes car elles permettent en 1 seul geste d'obtenir un prélèvement d'ADN et de marquer les animaux.

Pour des souriceaux de 7 à 10 J : Biopsie d'une ou deux phalanges distales couplée à l'identification par les phalanges

Pour des souriceaux de J21 : Biopsie à l'oreille couplée à une identification à l'oreille

Nous utilisons ces 2 méthodes recommandées par la FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association) en fonction de l'âge des souriceaux. La biopsie d'une ou maximum deux phalanges distales sur des souriceaux âgés de 7 à 10 jours est un geste peu douloureux car les terminaisons nerveuses et les cartilages ne sont pas encore développés au niveau des doigts. Cette méthode utilisée par de nombreuses animaleries expérimentales est la seule qui permette en 1 seul geste de marquer définitivement des souriceaux très jeunes (numérotation de 1 à 99 par

positionnement de la phalange sectionnée/doigt/4 pattes) et de prélever de l'ADN pour le génotypage (extrait à partir de la phalange biopsiée puis analyse PCR). Pour des animaux plus âgés (>21 jours) le piercing des oreilles permet une biopsie pour l'extraction d'ADN et un marquage à l'oreille par positionnement du trou.

Respect de la règle des 3R :

Raffinement :

Le prélèvement de la phalange distale est fait à l'aide de petits ciseaux entre 7 et 10 jours après la naissance des souriceaux. Cette biopsie réalisée par un personnel compétent ne dure que quelques secondes et ne semble pas induire de douleur (absence de réaction du souriceau). Celle-ci est formellement interdite après J10 car devient douloureuse et occasionne un saignement important. La numérotation des souris par positionnement de la phalange sectionnée permet un marquage à vie de l'animal sans contrainte ni effet sur sa locomotion et sans séquel d'hypersensibilité (comme démontrés dans plusieurs publications de la FELASA). Ces données sont en faveur d'un respect du bien-être de l'animal. Le prélèvement d'ADN avant J10 permet d'avoir les résultats du génotypage avant le sevrage des animaux à J21. Cette précocité d'obtention du génotype est indispensable pour regrouper des animaux issus de plusieurs portées en cage de même génotype et ainsi éviter des bagarres et blessures notamment entre les mâles lors d'un regroupement plus tardif de souris adultes.

Remplacement :

Nos contraintes expérimentales nécessitent l'obtention du génotypage des souris génétiquement modifiées avant leur sevrage et associé à un marquage permanent de l'animal. A notre connaissance les méthodes alternatives à une biopsie d'une phalange distale ne permettent pas de marquer et génotyper des souriceaux de moins de 10J. En effet, les méthodes alternatives pour le prélèvement d'ADN (prélèvement de sang, prélèvement de bout de queue, prélèvement de bout d'oreille) sont impossibles à réaliser sur des souriceaux de 7 à 10 J et/ou ne permettent pas de marquer les animaux.

Réduction :

La biopsie d'une phalange distale pour assurer le marquage/génotypage des souris sera strictement limitée aux souriceaux de moins de 10 jours qui nécessitent un génotypage.

Les souris âgées de plus de 10J seront marquées post sevrage (J21) par piercing aux oreilles et extraction d'ADN sur l'emporte-pièce ou réalisation d'un prélèvement sanguin sous anesthésie gazeuse si nécessaire.

Les animaux ne nécessitant pas de prélèvement d'ADN pour génotypage (souches consanguines "sauvages" ou élevés à l'état homozygote) seront marqués par piercing ou bague numérotée aux oreilles à J21.

Le nombre de souris à identifier et à génotyper est basé sur la fréquence des mises-bas. Le nombre de mises-bas est estimé à 2000/an pour les élevages de souris génétiquement modifiées. Le nombre de petits/portée est estimé à 10. Le nombre total de souriceaux biopsiés/identifiés est estimé à 20 000/an soient 100 000 souriceaux pour 5 ans.

10786 L'obésité est tout à la fois une pathologie invalidante et un facteur de risque pour d'autres affections potentiellement mortelles. Il n'existe pas de solution thérapeutique simple pour la vaincre de façon durable. Parmi les affections venant se greffer sur l'obésité, le diabète de type II est le plus fréquent et le plus sujet à des conséquences qui engagent le pronostic vital à moyen terme. Certaines substances pharmaceutiques qui se comportent comme une hormone naturelle sécrétée par l'intestin grêle immédiatement après l'estomac (GLP-1) apportent une pierre à la cascade thérapeutique mais l'efficacité de ces dernières est limitée notamment par notre compréhension parcellaire de l'évolution de la maladie. Notre étude vise à apporter des éclaircissements sur un point particulier de l'histoire naturelle de l'obésité : l'évolution de la densité des récepteurs à l'hormone citée plus haut (GLP-1) sur tous les organes pertinents en termes d'homéostasie glucidique. Pour cela, notre approche repose essentiellement sur l'imagerie afin de respecter les

objectifs de la règle des 3R. La réduction du nombre d'animaux est permise par l'utilisation de l'imagerie nucléaire permettant un suivi longitudinal des sujets plutôt que de mettre à mort les animaux à chaque étape du protocole. La réduction de la douleur est permise par la réalisation des imageries au cours d'un protocole anesthésique et de réveil adapté et pratiqué selon les règles utilisées chez l'homme. L'objectif de raffinement est assuré par la mise en œuvre des méthodes constituant l'état de l'art en la matière. Celles-ci comprennent (1) la mise en œuvre d'imagerie non invasive, (2) l'utilisation exclusive de l'anesthésie pour la réalisation des expériences proprement dites et (3) l'adaptation de l'environnement des animaux dans l'intervalle des imageries (climatisation, limitation du stress, enrichissement du milieu). Notre programme nécessite l'utilisation de 10 porcs adultes Yucatan rendus successivement obèses puis diabétiques de type II. Nous avons décidé d'utiliser cette espèce animale comme modèle de l'homme car l'imagerie de la fonction cérébrale exige un cerveau de taille importante et présentant des circonvolutions proches de celles de l'homme afin d'avoir une résolution spatiale suffisante. De même, l'imagerie de l'abdomen nécessite un organe de volume suffisamment important qui ne pourrait pas être obtenu chez un modèle rongeur.

10787 Les maladies infectieuses constituent un problème de santé majeur dans le monde notamment la maladie de Lyme, l'anaplasmose humaine et l'aspergillose causées par *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* et *Aspergillus fumigatus* respectivement. Aucun vaccin efficace n'existe contre ces agents pathogènes. De manière remarquable, tous ces micro-organismes produisent un antigène commun, l'hydrate de carbone α -Gal. Chez les animaux, l' α -Gal est produit chez tous les mammifères, à l'exception des humains et des singes qui ont perdu la capacité de synthétiser ce glucide. Cela a abouti à une capacité presque unique de ces mammifères à produire des titres d'anticorps élevés contre α -Gal. L'hypothèse a été émise que la perte de α -Gal chez l'ancêtre de l'homme était un événement évolutif ayant un impact négatif sur la résistance aux maladies infectieuses. En effet lorsque l'on immunise des souris avec des anticorps α -Gal (par vaccination ou par ingestion de bactéries produisant de l' α -Gal), la souris produit des anticorps anti- α -Gal (IgM et IgG) qui la protège contre les agents pathogènes exprimant α -Gal à leur surface, comme par exemple le parasite responsable du paludisme.

En revanche, la réponse des anticorps IgE contre α -Gal à la suite d'une piqûre de tique a été associée à un retard de l'allergie induite par l'ingestion de viande rouge (appelée « syndrome de α -Gal », AGS). Cela suggère que, bien que les IgM et les IgG anti α -Gal puissent protéger contre certains agents pathogènes, les IgE anti α -Gal pourraient plutôt favoriser les allergies nocives.

Ainsi, l'immunité anti α -Gal constitue un bon modèle pour étudier comment les anticorps dirigés contre l' α -Gal pourraient favoriser une allergie et / ou une protection contre la transmission d'agents pathogènes.

Le but de ce projet est de comprendre l'équilibre entre ces deux réponses immunitaires à l' α -Gal, ce qui pourrait conduire à des interventions pour contrôler à la fois l'AGS et l'infection par des agents pathogènes. Pour cela, des souris sans Alpha-Gal serviront de modèle pour mimer ce qui se passe chez l'Homme comparativement à des souris sauvages qui produisent de l'Alpha-gal naturellement. Les protocoles ont été conçus dans les règles des 3 R, ces expériences nécessitent l'utilisation des animaux car il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant de tester ces réponses immunitaires. Pas de souffrance particulière attendue suite au gorgement des tiques ou aux infections, cependant des points limites ont été définis. Au total 888 Souris C57BL/6, 888 Souris Alpha-Gal KO, 49 Lapins, et 144 Souris C3H/He seront utilisés pour les 5 ans du projet.

10788 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'une série de composés pharmaceutiques en développement destinés à l'amélioration des troubles métaboliques, notamment l'obésité et le diabète de type II associé. L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ces composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et la régulation glycémique chez un modèle de souris obèse ob/ob. Elle permettra d'établir un premier screening des différents composés et d'identifier les molécules dont le développement est à prioriser sur la base de leur efficacité préclinique.

Le traitement sera administré par voie orale pendant 10 jours au cours desquels la prise alimentaire et le poids corporel seront mesurés quotidiennement (D1-D10). Un test de tolérance oral au glucose (OGTT) sera pratiqué le dernier jour de traitement (D10) après 8h de mise à jeun. Pour comparaison, la glycémie et l'insulinémie à jeun seront mesurés après 8h de mise à jeun, la veille du premier traitement (D-1). A D11, les animaux seront anesthésiés et un prélèvement sanguin sera pratiqué par ponction cardiaque. Après euthanasie, des prélèvements d'organes seront pratiqués pour analyses ultérieures (foie, tissu adipeux, cœur).

La présente étude couvre le screening de 20 composés en développement qui seront testés par lots de 5. Chaque lot inclura, outre les groupes traités par les composés à tester, un groupe témoin (traité au véhicule) et un contrôle positif (composé de référence de la même classe thérapeutique que les composés testés dans le lot), soit un total de 7 groupes. Chaque groupe d'animaux sera composé de 9 souris et donc chaque lot sera composé de 63 animaux (9*7groupes). L'étude emploiera ainsi un total de $4 \times 9 \times 7 = 252$ souris ob/ob.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

- Raffinement : Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et les troubles métaboliques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages collectives (3 souris/cage) et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification.

Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté pour chaque série expérimentale en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et la régulation glycémique.

10789 La déficience en facteur VII, un facteur de coagulation du sang produit par le foie, est à l'origine d'un trouble hémorragique rare affectant 1 personne sur 300 000 à 1 personne sur 500 000. Cette pathologie est caractérisée par la diminution de la capacité à stopper les saignements. Les symptômes de cette maladie peuvent commencer à n'importe quel âge, bien que les cas les plus graves soient apparents dès l'enfance.

La forme héréditaire de la déficience en facteur VII, connue sous le nom de déficience congénitale en facteur VII, est transmise de façon génétique à la descendance. Elle est causée par des mutations du gène F7, qui fournit des instructions pour la fabrication d'une protéine appelée facteur VII de la coagulation. Cette protéine joue un rôle essentiel dans le système de coagulation : elle permet de former des caillots sanguins en réponse à une blessure. Quand le gène la fabriquant est muté, la quantité de facteur de coagulation VII est réduite dans la circulation sanguine, ce qui empêche la coagulation normale du sang et provoque des épisodes de saignements excessifs.

Notre projet vise à développer une nouvelle stratégie thérapeutique pour traiter la déficience du facteur VII de la coagulation en amenant dans le foie une molécule capable de corriger la fabrication de la protéine.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour faire ces preuves de concept thérapeutique, car les modèles cellulaires de la maladie n'existent pas. Pour vérifier l'efficacité des traitements, il faut vérifier la réduction du temps de saignement, ce qui nécessite d'avoir recours à un modèle animal. Le déficit complet en facteur VII a été testé dans un laboratoire et est létal chez la souris. Pour ces raisons, nous avons produit un nouveau modèle murin qui permet de reproduire avec fidélité

l'ensemble des aspects moléculaires de la maladie humaine (réduction d'expression du facteur VII, temps de coagulation prolongé).

Nous avons testé dans des modèles de cellules de foie la capacité de 5 molécules différentes à augmenter la fabrication du facteur VII : ces tests préliminaires nous ont permis de sélectionner la molécule plus efficace, qui sera la seule administrée aux souris. Ce test de criblage a permis d'économiser jusqu'à 80 souris.

Afin de raffiner nos études, si les animaux se font des plaies importantes, des soins locaux seront appliqués afin de faciliter la coagulation, qui est moins efficace que chez des animaux normaux. Si les souris se battent, le nombre de souris par cage sera réduit afin de limiter les risques de bagarres. Si une souris est dominante, elle sera séparée de ses congénères.

Les vecteurs thérapeutiques apportées sont connus pour générer une réponse immunitaire faible ou inexistante, sans conséquences pour la santé de l'animal. Ils seront véhiculés dans un tampon salin neutre. Un important bénéfice thérapeutique est attendu.

Le nombre de souris nécessaire a été estimé à 10 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes). Les souris seront élevées et reproduites dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation totale de 70 souris.

10790 Ce projet a pour objectif d'assurer la fourniture des produits biologiques, d'origine animale, nécessaires à la réalisation des tests de contrôle qualité assurant la mise sur le marché de lots de vaccins conformes aux normes de sécurité et d'activité. Les produits biologiques (globules rouges, anticorps polyclonaux) sont nécessaires pour la mise en œuvre de tests *in vitro* ; à ce jour, ils ne peuvent pas toujours être produits sans le recours à l'animal de laboratoire. Les tests de contrôle qualité sont des tests réglementaires pour les vaccins commercialisés et pour les produits en développement. Ce projet pourra engendrer l'utilisation d'au maximum 1500 cobayes, 1200 lapins, 80 furets et 300 souris sur une période de 5 ans.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Les produits d'origine animale sont utilisés uniquement lorsque des produits fabriqués *in vitro* (anticorps polyclonaux) ne sont pas disponibles ou adaptés à l'utilisation visée. Le sang (globules rouges) est obligatoirement issu d'animaux en parfaite santé.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés est calculé au plus juste de façon à répondre aux besoins de tests sur la période (quantité de réactifs). Ce calcul tient compte des durées de péremption des produits mais aussi des évolutions technologiques pour les tests considérés et des perspectives de marché pour les vaccins produits.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement (abris, surfaces de repos) dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires. Les protocoles encadrant la collecte de sang ou l'immunisation d'animaux avec des mélanges d'antigènes et d'adjuvants n'entraînant pas de réactions locales ou générales ne présentent pas de risque pour les animaux. Dans le cas où les animaux présenteraient des lésions cutanées des soins appropriés seront réalisés. Tout animal qui présenterait une perte d'état général ou une maladie sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée. La prise en charge d'un animal ayant des signes de maladie est assurée par un vétérinaire.

Pour les cobayes il s'agit d'un geste technique sous anesthésie, sans réveil de l'animal. Pour l'immunisation des lapins, la nature du mélange antigène et adjuvant utilisé est susceptible d'entraîner des réactions de type allergique ou des réactions locales aux sites d'injection. Le degré de sévérité est considéré comme modéré et pouvant aller jusqu'à sévère pour une faible proportion de lapins (15%).

Pour les furets et les souris, le degré de sévérité est léger.

L'ensemble des animaux est euthanasié selon des méthodes recommandées par la réglementation et approuvées par le Comité d'éthique et la Structure de Bien-être Animal.

10791 Le cancer constitue la seconde cause de mortalité dans le monde avec près de 8.8 millions de décès en 2015 selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Les traitements courants comprenant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie sont lourds pour les patients et leurs résultats ne sont pas garantis. La raison principale étant qu'il est aujourd'hui encore très difficile de cibler uniquement mais intégralement les cellules cancéreuses.

Les bactéries utilisées dans cette étude ont pour objectif de cibler les tumeurs et de délivrer en leur sein, des molécules anti-cancéreuses. Pour cela, ces bactéries ont été modifiées afin de réduire leur virulence, ainsi elles seront inoffensives dans un environnement sain (système immunitaire normal) mais proliféreront dans un environnement tumoral (système immunitaire perturbé). Ce qui en fait d'excellents transporteurs de molécules anti-cancéreuses.

Le but de cette étude est d'évaluer la toxicité de 4 doses différentes de ces bactéries chez le lapin sain après administration par voie intra-artérielle.

Des études ont déjà été réalisées chez la souris porteuse de tumeur. Les résultats prometteurs poussent à tester ce traitement sur un modèle non-rongeur afin d'évaluer les risques d'une telle thérapie avant de passer au test clinique chez l'homme. 8 lapins seront nécessaires à la réalisation de cette étude soit uniquement 2 lapins par dose.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R :

Remplacer : Une partie des résultats préliminaires a été réalisée *in vitro* mais la complexité d'un être vivant ne peut pas être mimée en laboratoire nécessitant l'utilisation de modèles animaux.

Réduire : Cette étude a été construite en utilisant le nombre minimum d'animaux (seulement 2 par groupe) permettant une comparaison de l'effet des 4 doses testées.

Raffiner : la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections intra-artérielles, prélèvements sanguins et mises à mort) sera réalisée sous anesthésie locale ou générale.

10792 Un des principaux enjeux de l'élevage des lapins est la réduction de l'utilisation des antibiotiques. Actuellement, ces molécules sont souvent administrées aux jeunes lapereaux pendant les trois premières semaines qui suivent leur sevrage pour prévenir l'apparition de troubles digestifs. Pour le consommateur cette pratique ne représente aucun risque direct, car un temps d'attente est imposé pour tous les animaux traités avant leur entrée dans la chaîne alimentaire. Néanmoins, l'utilisation systématique d'antibiotiques peut entraîner l'apparition de bactéries résistantes, très difficiles à contrôler lors d'infections ce qui représente un risque (impasse thérapeutique) pour la santé des animaux et des hommes.

Dans ce contexte, la recherche de méthodes permettant l'élevage d'animaux sans utilisation systématique d'antibiotiques, tout en garantissant la santé et le bien-être des animaux, est nécessaire. L'objectif finalisé de ce projet est donc de tester une méthode d'élevage innovante, sans utilisation préventive d'antibiotiques.

Le projet se base sur un des piliers de l'écologie : la biodiversité. Actuellement, l'utilisation de races de lapins sélectionnées sur la productivité a réduit la diversité génétique au sein du troupeau. Nous formulons l'hypothèse que cette réduction de la biodiversité a rendu les animaux plus fragiles et par extension génère une dépendance des élevages aux traitements antibiotiques.

Afin, d'augmenter la diversité génétique et la résistance aux maladies des lapins, nous proposons de constituer un troupeau « mosaïque » et de raisonner à l'échelle du troupeau et non de l'individu pour trouver un équilibre entre productivité et santé. Deux races des lapins (une race sélectionnée sur la productivité et une race renommée pour sa rusticité) seront élevées simultanément dans un même milieu. La race productive apportera la valence économique (productivité) et la race rustique apportera la valence santé au troupeau. Un équilibre entre les valences est attendu. Si nous

apportons la preuve de ce concept il pourrait être décliné dans d'autres filières de production animales.

Deux essais sont prévus (A et B) dans l'ensemble du projet. L'essai A a pour objectif la constitution d'un troupeau expérimental de la race rustique, ainsi que l'obtention de données scientifiques permettant le raffinement des protocoles prévus dans l'essai B. Quarante femelles et dix mâles de la race rustique seront accouplés (sur trois cycles de reproduction de 42 jours chacun) pour générer 70 femelles et 20 mâles pour établir le troupeau parental de la race rustique utilisée dans l'essai B. Sur ces trois cycles de reproduction, nous estimons obtenir 350 lapereaux.

Dans l'essai B, nous constituerons pour chacune des deux races, deux groupes nourris avec un aliment différent, et pour chaque aliment, il y aura ou pas des adoptions croisées entre race. Nous aurons donc huit groupes pour lesquels nous suivrons les taux de morbidité (pourcentage d'animaux malades) et de mortalité des jeunes lapereaux qui seront élevés sans aucun traitement antibiotique préventif. Vu que ces deux variables sont difficiles à prédire, le nombre d'individus à suivre sera élevé pour permettre les études statistiques. Ces lapereaux seront obtenus à partir de 140 femelles (70 de chaque race) et 40 mâles (20 de chaque race) suivis pendant cinq cycles de reproduction. Le nombre de reproducteurs nécessaires a été calculé en fonction des taux fertilité et prolificité et de la survie des reproducteurs de chaque race. Au total, le nombre estimé de jeunes lapereaux nés dans l'essai B est de 2860.

Dans l'ensemble du projet, nous aurons donc un nombre total estimé de 3350 lapins (Essai A : 50 reproducteurs + 350 lapereaux = 400 lapins ; Essai B : 180 reproducteurs + 2860 lapereaux = 3040 lapins ; moins 90 lapins de la race rustique nés dans l'essai A pour la réalisation de l'essai B).

Pour mesurer l'impact de l'augmentation de la biodiversité sur l'état de santé des lapins, et pour étudier la possibilité d'utiliser des marqueurs sanguins comme critères de sélection pour améliorer la robustesse des animaux, des prises de sang ponctuelles seront réalisées sur un total de 1535 lapereaux (Essai A = 15 ; Essai B = 1520) et 80 mères (Essai B). Pour détecter des régions du génome lié à la robustesse, l'ADN de biopsies d'oreilles prélevées sur les 180 reproducteurs de l'essai B sera conservé. Les animaux seront manipulés avec tact et douceur par des personnes formées et capables de déceler des signes de détresse chez les lapins. Un protocole strict de contention, prélèvement de sang, prélèvement de biopsie et soins des animaux concernés sera mis en place afin de réduire le stress et la douleur éventuelle.

Les animaux seront hébergés dans des conditions similaires à celles de l'élevage commercial afin que les résultats de notre étude puissent être appliqués sur le terrain. Dans ce même objectif, il n'est pas possible de remplacer les lapins par des approches *in vitro* ou de simulation.

Si le nombre d'animaux malade venait à dépasser 15% d'un lot, nous prévoyons l'application de traitements médicamenteux curatifs ponctuels, afin de réduire la douleur et la détresse des animaux concernés. Si ce nombre venait à dépasser 20% des lapins d'un lot, l'étude serait immédiatement arrêtée.

10793 La radiothérapie est la thérapie ciblée permettant de traiter de façon curative des formes avancées de cancer. Plus d'un patient sur deux en bénéficie. L'efficacité de la radiothérapie s'explique par la mort des cellules tumorales qui dépend de la dose. Mais l'efficacité anti tumorale est plus complexe et dépend aussi du système immunitaire de l'hôte. Les progrès en immunologie ont permis de faire régresser complètement et de façon durable des maladies métastatiques autrefois incurables. Néanmoins, seule une moitié des patients va pouvoir en bénéficier avec une réponse d'une durée variable. Des combinaisons associant de la radiothérapie et de l'immunothérapie montrent une amélioration de l'efficacité de la radiothérapie et de l'immunothérapie sans majorer les effets indésirables. Une grande partie de l'efficacité de la radiothérapie s'explique aussi par l'action de lymphocytes tueurs. L'efficacité systémique de la radiothérapie varie selon la dose et la dose par séance. Lorsqu'on délivre une dose adéquate, une inflammation est générée favorisant ensuite l'infiltration de cellules immunitaires. La radiothérapie altère à la fois les cellules immunitaire pro tumorale et les cellules immunitaires anti tumorales. Mais l'impact de la radiothérapie elle-même sur chacune des populations cellulaires infiltrée n'est pas encore connu. Si la tumeur présente une

faible immunogénicité et si elle disparaît du fait d'une taille trop faible, le système immunitaire pourrait ne pas avoir de matériel suffisant pour construire une réponse soutenue et prévenir les récives. Au cours d'un essai clinique, des patients dont les tumeurs étaient trop volumineuses pour être irradiées en totalité l'ont été partiellement dans un volume limité à 65 ml de tumeur et malgré la taille plus importante de leur tumeur, ils auraient présenté un contrôle tumoral similaire et satisfaisant. Le système immunitaire dans la partie non irradiée a-t-il permis d'éliminer les cellules tumorales n'ayant pas été irradiées ?

Ce projet consiste en l'analyse de la croissance tumorale et de l'infiltrat leucocytaire intra tumoral après l'irradiation de l'ensemble ou d'une partie de la tumeur à différentes doses. Nous allons rechercher une association entre la croissance tumorale et l'infiltrat leucocytaire et décrire la cinétique de ce phénomène. Nous comparerons l'infiltration immunitaire à ces deux pôles afin d'identifier si l'infiltration immune en territoire non-irradié diffère.

Pour approfondir cette compréhension, nous devons réaliser 4 procédures afin de : 1) sélectionner les doses d'irradiation pertinentes (irradiation totale de la tumeur) ; 2) établir la cinétique d'infiltration tumorale en cas d'irradiation totale ; 3) analyser l'évolution de la tumeur et de l'état général de l'animal dans des cas d'irradiation partielle de tumeur et 4) établir la cinétique d'infiltration tumorale en cas d'irradiation partielle.

Ces procédures expérimentales nécessitent 2175 souris.

La souris est l'animal le plus utilisé dans ce domaine de la recherche avec des résultats qui ont permis à de nombreux traitements d'être testés chez l'homme avec moins de risque et plus de chance de réussite. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Des calculs statistiques sont réalisés en amont et ont été validés par le comité scientifique en charge du suivi de ce projet. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. La limitation de la capacité des souris de satisfaire leurs besoins physiologiques et éthologiques seront limitées au strict minimum en enrichissant leur environnement par du coton ou des nids en carton et en leur permettant de vivre en groupe de 2 à 5 souris. Des mesures seront prises pour mettre fin dans les délais les plus brefs à toute anomalie ou à toute douleur, toute souffrance, toute angoisse ou tout dommage durable constatés qui pourraient être évités en définissant des points limites précis et adaptés. L'euthanasie des animaux sera effectuée par dislocation cervicale, en limitant le plus possible la douleur, la souffrance et l'angoisse des souris, par une personne compétente de l'établissement utilisateur.

10794 Les hormones thyroïdiennes (HT) et les glucocorticoïdes (GC) contrôlent de nombreux processus biologiques en régulant l'expression des gènes. Des perturbations de la signalisation de ces hormones à la période périnatale sont à l'origine de diverses pathologies qui peuvent se manifester tout au long de la vie et qui constituent des problèmes majeurs de santé publique puisqu'elles concernent le cancer, l'obésité, le diabète, des maladies cardiovasculaires et métaboliques ainsi que des retards mentaux. Les travaux de notre équipe ont pour objectifs de caractériser l'effet des GC sur l'expression des gènes contrôlés par les HT. Pour réaliser ces études nous utilisons comme modèle un amphibien anoure (*Xenopus tropicalis*) qui constitue un modèle classique pour étudier l'action des HT. En effet, il passe de l'état de têtard à l'état adulte au cours d'une période de développement qui est la métamorphose. Cette étape est régulée par les HT et présente de nombreuses similitudes avec la période périnatale chez les mammifères (maturation de nombreux organes en adéquation avec le changement d'environnement, aquatique vers aérien).

Ce projet est en continuité avec nos travaux antérieurs qui ont montré l'existence d'interactions entre les deux voies de signalisation hormonale dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles. Les objectifs sont doubles : (i) développer une technologie permettant de questionner l'organisation tridimensionnelle du noyau (technologie 4C), (ii) l'appliquer pour localiser les séquences régulatrices (enhancers/silencers) qui interagissent avec les promoteurs des gènes corégulés par les HT et GC dans le tissu hépatique.

Pour cette étude, nous mettrons en œuvre une procédure qui consistera à traiter les têtards, avec chaque hormone individuellement ou conjointement. Cette procédure nécessitera 720 têtards pour la première partie, puis 240 pour la seconde, soit un total de 960 animaux.

Le nombre de têtards considérés correspond à l'effectif minimum requis pour obtenir la quantité de matériel biologique suffisante pour réaliser les étapes de biologie moléculaire. Le déroulement du projet en deux étapes permet d'optimiser les paramètres expérimentaux et de limiter ainsi au maximum le nombre d'animaux utilisés. Un maximum de tissus différents sera prélevé sur chacun des têtards.

Les animaux sont hébergés dans des aquariums où le milieu est rigoureusement contrôlé. L'eau est changée régulièrement, la température, le pH, ainsi que la conductivité sont vérifiés quotidiennement. Les teneurs en nitrites et en nitrates sont mesurées toutes les semaines. Les animaux sont nourris. Ils font l'objet d'un suivi quotidien et tout animal présentant des signes pathologiques ou comportementaux anormaux (défaut de nage) est euthanasié. Les traitements ne sont pas susceptibles de modifier le comportement des têtards pendant la période expérimentale.

Des modèles *ex vivo* adaptés à notre projet, tels que des lignées cellulaires, ne sont pas disponibles chez le Xénope, ce qui ne permet pas actuellement de s'affranchir de l'expérimentation *in vivo*. Cependant, nous restons attentifs à toute innovation qui nous permettrait de remplacer l'expérimentation animale. De plus, afin de ne pas créer de dommages aux animaux en les manipulant, les traitements hormonaux sont uniquement réalisés en balnéation, par addition d'hormones dans l'eau des aquariums. Le bénéfice attendu dans le cadre de ce projet est une meilleure connaissance du dialogue existant entre les deux voies de signalisation (HT et GC) en fonction du destin cellulaire des tissus et organes, dialogue encore largement méconnu.

10795 Les biomédicaments sont des thérapies ciblant des acteurs cellulaires ou moléculaires impliqués dans la physiopathologie des maladies. Les traitements anti-TNF α font partie de cette catégorie. Les anti-TNF- α ont révolutionné la prise en charge de maladies comme la polyarthrite rhumatoïde (PR), les spondylarthrites, le psoriasis ou encore les maladies inflammatoires de l'intestin. Les études d'efficacité rapportent qu'environ 60 à 70% des patients répondent à ce traitement.

L'administration des biomédicaments peut induire une réponse du système immunitaire qui produit des anticorps anti biomédicament. On parle d'immunisation anti biomédicament. Il a été démontré que ces anticorps accélèrent l'élimination des biomédicaments par l'organisme participant à la perte d'efficacité. Ainsi, diminuer l'immunisation anti biomédicament pourrait améliorer leur efficacité.

Il existe des données dans la littérature scientifique montrant que la co-prescription de traitement immuno-modulateur (le méthotrexate (MTX) avec les biomédicaments pourrait permettre de réduire l'immunisation anti médicament et ainsi d'augmenter l'efficacité des traitements.

L'objectif primaire de ce projet est d'étudier le mode d'action du MTX dans la prévention de l'immunisation anti-biomédicament. Cette action doit passer par un effet tolérisateur du MTX qui expliquerait également son mode d'action en tant qu'immuno-modulateur, mode d'action mal compris à l'heure actuelle.

De telles études nécessitant l'analyse des phénomènes dans différents organes, dans plusieurs types cellulaires et selon des séquences temporelles précises suivant l'immunisation. Ils ne peuvent, en conséquence, qu'être réalisées que sur des organismes entiers. Le modèle animal est donc nécessaire pour réunir le maximum d'informations permettant de comprendre les phénomènes immunitaires survenant chez les patients.

Le modèle animal retenu pour ce projet est la souris. En effet, l'utilisation de biomédicaments humanisés s'associe à un taux d'immunisation proche de 100% chez la souris, ce qui en fait un modèle idéal pour l'étude de la prévention de ce phénomène. De plus, notre équipe a déjà obtenu des résultats préliminaires intéressants sur l'effet positif du MTX pour l'obtention de la tolérisation dans un modèle murin spécifique mimant la PR dans ses manifestations cliniques, biologiques et immunologiques.

Nos données préliminaires ont permis d'affiner au maximum le nombre d'animaux nécessaire par groupe pour un effectif maximal de 10 souris/groupe tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non-paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies afin d'éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administrations et prélèvements sous anesthésie, limitations des volumes de sang prélevés). La durée de la phase de traitement sera réduite au minimum (8 semaines) alors que l'ensemble des analyses biochimiques et immunologiques s'étalera sur 4 ans

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 152 animaux provenant d'élevages autorisés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires des traitements). Dans ce cas, des traitements appropriés seront mis en œuvre.

A terme ce travail pourrait avoir des retombées importantes afin de prévenir le problème de l'immunisation anti biomédicament mais également dans l'optimisation des traitements immuno-modulateurs au cours des maladies auto-immunes.

10796 Les troubles envahissants du développement, dont les troubles du spectre autistique (TSA) sont associés à des dysfonctionnements du comportement, de la cognition et de la perception. Un nombre croissant de preuves associe aussi depuis peu les TSA avec des troubles moteurs complexes, dont l'ataxie. Plusieurs cliniciens vont jusqu'à proposer que ces déficits moteurs puissent être prédictifs des TSA surtout qu'ils semblent apparaître avant les troubles comportementaux et cognitifs. L'objectif du projet est d'utiliser un modèle animal transgénique de l'autisme (Shank3 : souris C57BL/6J), de caractériser leur activité motrice, qui n'a que peu été réalisé auparavant, et de disséquer les réseaux neuronaux impliqués dans ce trouble au niveau anatomique, électrophysiologique et neurochimique.

Les modèles animaux de souris dans ces pathologies se sont révélés d'une grande utilité car ils permettent une étude horizontale allant de l'observation comportementale, à l'analyse des réseaux neuronaux et la détermination des messagers chimiques sous-jacents. La souris, et plus spécifiquement celle de race C57BL/6J est très utilisée comme modèle animal de troubles neurologiques et psychiatriques. De plus, l'utilisation de cette espèce et de cette race ouvre la porte à l'utilisation de souris transgéniques portant des mutations spécifiques en phase avec notre projet de recherche sur l'autisme. Les rongeurs sont à ce jour les espèces modèles de petite taille ayant un système nerveux moteur proche de l'Homme. Les souris (*Mus musculus*) ont l'avantage d'être un modèle de choix pour les études comportementales.

La procédure expérimentale de ce projet consiste en une chirurgie stéréotaxique nous permettant d'injecter de façon très précise des vecteurs viraux dans la région du striatum et du cortex moteur de souris nous donnant ainsi l'accès à l'activation des interneurons parvalbumine par optogénétique. L'optogénétique est la capacité de contrôler en temps réels l'activité d'une population cellulaire spécifique par la lumière.

Afin d'être en conformité aux règles 3R :

1) Remplacer : Le projet vise à caractériser les dysfonctionnements cognitifs et moteurs d'un modèle animal des TSA et à comprendre les mécanismes sous-jacents les déficits comportementaux observés. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier.

2) Réduire : (i) nous utiliserons des protocoles expérimentaux utilisés en routine dans le laboratoire qui ne nécessitent pas d'optimisation, (ii) nous utiliserons les mâles et les femelles pour notre étude et collecterons le maximum d'échantillons possible afin d'extraire le plus d'information par animal sacrifié, (iii) Un calcul de puissance statistique a été utilisé pour minimiser le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des données significatives.

3) Raffiner : Nous mettrons tout en œuvre pour soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des animaux. Ainsi, et d'après nos estimations, nous aurons besoins de : 3 (groupes) x15 (animaux/groupes) x2 (sexes) x2 (sites d'injection striatum et cortex) = 180. Ainsi le nombre total des animaux utilisés pour cette étude est de 180. Nous émettons l'hypothèse que cette

caractérisation peut ouvrir une nouvelle voie dans le diagnostic quantitatif de ces troubles, et potentiellement identifier les réseaux neuronaux communs qui sous-tendent les troubles moteurs et cognitifs caractéristiques de ces pathologies.

10797 Le métabolisme énergétique joue un rôle important dans le devenir des tissus, en agissant sur leur développement et leur longévité. Il existe une famille de protéines - les sirtuines - capables de ressentir ce métabolisme et de contrôler ainsi la fonction tissulaire et la longévité des organismes. Sirt3 est considérée comme la sirtuine la plus importante dans la mitochondrie et elle contrôle le métabolisme des nutriments, la synthèse d'énergie, et les défenses antioxydantes.

Chez l'homme et la souris, il existe deux formes de Sirt3, dont la fonction n'est pas clairement identifiée. Les animaux dépourvus de Sirt3 présentent une altération de la fonction mitochondriale qui nuit au métabolisme de tissus tels que le muscle squelettique. De plus, il a été récemment montré que des altérations de la quantité de Sirt3 dans le muscle étaient associées à une aggravation de l'ataxie de Friedreich.

De manière intéressante, à l'aide de souris surexprimant spécifiquement dans le muscle chaque forme, nous avons mis en évidence que l'une de ces deux formes entraînait une atrophie musculaire dès 3 mois et cette dernière s'aggrave avec l'âge des animaux (3 mois : 17 % d'atrophie, 6 mois : 34% d'atrophie). Ces résultats suggèrent qu'une dérégulation de l'expression et/ou de l'activité des formes de Sirt3 chez l'homme pourrait être à l'origine d'une atrophie musculaire prématurée et d'anomalies métaboliques.

Notre objectif est de déterminer la contribution relative de ces formes de Sirt3 dans la régulation du métabolisme et du développement du tissu musculaire.

Ce travail apportera de nouvelles connaissances concernant la régulation des isoformes de Sirt3 dans le muscle squelettique et leur rôle potentiel dans l'apparition de pathologies musculaires.

Nous proposons d'utiliser 98 souris sauvages (WT), 98 souris transgéniques TG Sirt3 M1, et 98 souris transgéniques TG Sirt3 M3. Les souris sauvages seront issues des mêmes portées que les souris transgéniques (49 issues des portées Sirt3 M1 et 49 issues des portées Sirt3 M3). Les animaux seront répartis dans 6 procédures expérimentales.

Pour ce projet, les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux, à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et pour palier l'abandon de certaines souris dans l'expérimentation. Pour réduire le nombre de souris sauvages nécessaire, nous utiliserons celles issues des portées de souris transgéniques +/-.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "endpoints") : Comme développé pour chacun de nos protocoles expérimentaux, nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos animaux. Les suivis quotidiens des animaux permettent d'identifier des signes de souffrance. Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou perte de poids excessive ($\geq 15\%$ du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales. De plus, ces procédures expérimentales concernent des modèles murins génétiquement modifiés, peu diffusés et pour lesquels nous possédons un MTA (material transfert agreement). Ceci nous confère une certaine exclusivité sur le domaine et les procédures décrites ici ne devraient pas être reproduites par ailleurs.

10798 Le sélénium est un oligoélément essentiel qui est présent sous forme de trace dans l'organisme. Il joue un rôle primordial dans la régulation du stress oxydant en permettant le bon fonctionnement d'enzyme comme la glutathion peroxydase. Dans de nombreuses pathologies, une carence en sélénium est observée conduisant à une diminution des défenses de l'organisme. Afin de contrer

ces effets, une supplémentation en sélénium pourrait être apportée par le biais de l'alimentation. La spiruline est une cyanobactérie riche en protéines, oméga-6, fer, phycocyanine et vitamines et possède une activité antioxydante. Elle présente également la faculté d'agir comme un véritable vecteur de sélénium. Dans cette demande d'autorisation de projet, nous souhaiterions déterminer si l'ajout de spiruline sélénée dans la boisson modifie la prise de boisson chez le rat et vérifier notre capacité à suivre l'évolution de la concentration sanguine en sélénium. Il s'agit d'une demande d'autorisation de projet préliminaire dans le but, à terme, d'appliquer une supplémentation en spiruline sélénée dans la boisson dans notre modèle de rat septique, une pathologie connue pour induire une carence en sélénium. Ce futur projet, qui fera l'objet d'une autre demande d'autorisation de projet, aura pour but de déterminer si une supplémentation en spiruline, spiruline enrichie en sélénium ou sélénite de sodium a des effets positifs sur la préservation du capital protéique musculaire et sur l'activité antioxydante chez des rats septiques, problèmes récurrents retrouvés chez les patients atteints de sepsis dans les services de réanimation hospitaliers. Ainsi, cette demande d'autorisation de projet nous permettra de confirmer les méthodes utilisées dans la littérature scientifique et d'éviter tout désagrément sur la méthode de supplémentation. Pour cela nous souhaitons réaliser quatre groupes, le premier ne recevra que de l'eau, le deuxième supplémenté avec 1000 mg/kg de spiruline, le troisième avec 1000 mg/kg de spiruline sélénée et le dernier avec 0.4 mg/kg de sélénite de sodium.

Ce projet a une durée d'un mois. Il impliquera l'utilisation de 24 rats Wistar

Les expérimentations seront réalisées dans le respect de la règle des 3R :

- il s'agit d'une étude des effets au niveau de l'organisme pour laquelle le remplacement n'est pas possible.
- le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum permettant une étude statistique cohérente, et en accord avec le principe de réduction.
- le raffinement est respecté au niveau des conditions d'hébergement des animaux et au niveau des procédures d'anesthésie/Analgésie.

10799 Le diagnostic de l'infection toxoplasmique chez l'homme repose essentiellement sur la recherche des anticorps (sérologie de la toxoplasmose). Toutefois certaines formes de toxoplasmose (toxoplasmose congénitale, toxoplasmose sévère du patient immunocompétent, toxoplasmose symptomatique du patient immunodéprimé) peuvent nécessiter l'isolement du parasite à partir de produits pathologiques (liquide amniotique, placenta, sang, liquide de lavage bronchiolo-alvéolaire.). La détection peut se faire par technique de biologie moléculaire, mais la quantité d'ADN parasitaire étant souvent faible, elle ne permet pas toujours la caractérisation génétique de la souche. L'objectif de ces analyses est de tenter d'établir un lien entre la gravité de l'infection humaine et les caractéristiques génétiques de la souche infectante.

L'inoculation à la souris pour l'isolement du toxoplasme est un acte reconnu à la nomenclature des actes de biologie médicale pour le diagnostic de la toxoplasmose congénitale (Code NABM 4061 et 1435) et recommandé par la Haute Autorité de Santé (HAS) pour l'étude épidémiologique des souches responsables de toxoplasmose humaine en France.

Le service effectue ce diagnostic par inoculation non seulement pour les cas observés sur le site, mais aussi pour d'autres hôpitaux.

En cas d'isolement de souches, celles-ci sont génotypées et confiées à un centre hospitalier à des fins de cryoconservation et de distribution aux chercheurs.

Ce projet utilisera au total un maximum de 750 souris de laboratoire sur une durée totale de 5 ans.

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

Remplacer : La culture cellulaire est possible pour le toxoplasme. Elle est d'ailleurs prévue également au code NABM, mais elle est de moindre sensibilité que l'inoculation à la souris. Pour cette raison, elle a été abandonnée par tous les laboratoires de Parasitologie dans un cadre de diagnostic de la toxoplasmose humaine.

Réduire : Le nombre d'animaux indiqué par la nomenclature des actes de biologie médicale est de 6 souris par produit pathologique inoculé. Notre expérience nous a permis de réduire ce nombre à 3 sans nuire à la qualité du diagnostic pour le patient. Il peut cependant arriver qu'une seule souris sur les 3 soit positive lorsque le nombre de parasites dans l'inoculum est très faible, il n'est donc pas possible de réduire encore le nombre.

Par ailleurs, seuls les produits pathologiques les plus susceptibles d'être infectés, après analyse de l'ensemble du dossier du patient, sont inoculés, ce qui permet de réduire globalement le nombre d'animaux inoculés.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau à volonté, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (traitement antibiotique des prélèvements inoculés au souris afin d'anticiper toute surinfection de ces dernières, anesthésie lors des prélèvements, traitement antiparasitaire dans les très rares cas de souches parasitaires virulentes pour limité l'infection chez la souris).

10800 CONTEXTE :

Depuis de nombreuses années, le laboratoire focalise ses recherches sur la protection des organes ayant subi un épisode ischémique (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, greffe de cœur et de rein) et a su développer différents modèles murins mimant ces pathologies, afin d'en étudier les mécanismes et tester l'efficacité de nouveaux traitements. Aussi, dans le but d'approfondir et améliorer l'exploration de ces pathologies et leurs traitements, le laboratoire a fait l'acquisition d'un nouvel appareil d'imagerie de photoacoustique très performant et non invasif. Les images obtenues devront ainsi permettre de mieux comprendre certains mécanismes, mais également de réaliser des mesures répétées (non invasives) dans le temps pour suivre l'évolution des pathologies sur le moyen et long terme chez nos différents modèles *in vivo*. Cependant, il est indispensable de maîtriser parfaitement ce type d'appareil et d'obtenir des images pleinement exploitables en situation avant de pouvoir l'utiliser dans les différentes études du laboratoire.

OBJECTIFS :

Le recours à cette nouvelle technique d'imagerie constitue un raffinement très attendu pour les futures études *in vivo* du laboratoire.

Le présent projet constitue la phase incontournable préalable de validation technique, en conditions physiologique (prise en main de l'appareil), puis dans les différents contextes pathologiques étudiés (chez les 3 modèles murins régulièrement utilisés au laboratoire). L'objectif est ainsi de garantir que l'utilisation de ce nouvel outil dans les différents projets du laboratoire sera optimale et pertinente, réduisant in fine le nombre d'animaux utilisés dans ces projets.

DESCRIPTION DU PROJET :

Le projet se déroulera donc en deux phases successives :

La première phase, peu invasive, consiste à finaliser la formation pratique des opérateurs à la prise d'images exploitables avec mise au point de l'injection de produits de contraste permettant des mesures spécifiques. Cette phase reste complexe compte tenu des contraintes liées à la mesure *in vivo* sur petit animal (mouvements cardiaques et respiratoires rapides complexifiant la prise d'image, côtes et boîte crânienne interférant avec le signal, etc.) Cette étude portera donc sur 40 animaux maximum

La seconde phase doit permettre de mettre en évidence et quantifier les variations des paramètres mesurés suite à un épisode ischémique afin de valider le recours à cette technique d'imagerie pour les 3 modèles murins régulièrement utilisés au laboratoire. Ces mesures en conditions pathologiques nécessitent une phase chirurgicale complexe mais déjà bien maîtrisée au laboratoire. L'effectif total de cette étude s'élève donc à 14 animaux maximum.

PRISE EN COMPTE DES 3R :

Remplacement : En amont de ce projet, les opérateurs auront reçu une première formation théorique et pratique approfondie sur plusieurs jours par le fournisseur de l'équipement d'imagerie (sans animaux vivants). Des tests de mise en place de l'animal, de prise d'image et de mise en place de la voie d'injection du produit de contraste, auront également été menés au préalable à l'aide de cadavres d'animaux (animaux euthanasiés dans le cadre d'autres projets du laboratoire).

Réduction : l'ensemble des animaux vivant utilisés dans ce projet sont des animaux surnuméraires provenant d'élevages du laboratoire et donc non attribués à un projet et destinés à l'euthanasie. Par ailleurs, une experte en imagerie assistera aux prises d'images pour aiguiller les opérateurs et valider les images acquises, réduisant au mieux le temps d'apprentissage.

Raffinement : Tous les examens (incluant les chirurgies) sont réalisés sous anesthésie profonde et analgésie adaptée. Compte tenu de l'origine des animaux (décrite ci-dessus), il a par ailleurs été choisi de favoriser le raffinement par rapport à la réduction. Ainsi :

- Pour la phase 1 : ne sont réveillés en fin d'examen que les animaux pour lesquels il n'existe aucun risque de souffrance, douleur ou gêne jusqu'à l'examen suivant. Ces animaux bénéficient alors d'un suivi post-opératoire stricte pour s'assurer de l'absence effective de souffrance/douleur/gêne.

- Pour la phase 2 (comprenant une chirurgie), les animaux sont mis à mort en fin d'étude pendant l'anesthésie, (expérimentation sans réveil).

10801 Le traitement des maladies oculaires menant à la cécité qu'elles soient d'origine génétique comme la rétinite pigmentaire (RP) ou non comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) représente un enjeu majeur de santé publique. Ces deux maladies sont les plus connues du grand public mais de nombreuses autres mènent aussi irrémédiablement à la cécité. Partant du constat que les traitements actuels ne sont efficaces que sur une partie des patients concernés et que l'efficacité sur le long terme est une difficulté récurrente, il nous est apparu important de développer des méthodes alternatives comme la rétine artificielle. Les prothèses rétiniennes ou rétine artificielle proposent de remplacer les photorécepteurs détruits par un système de stimulation électrique des neurones résiduels.

Ce projet se décompose en 4 études.

* Première étude : analyse de la biocompatibilité de 20 nouveaux types d'implants dits non connectés et non stimulables par des analyses *in vivo* par différentes techniques d'imagerie de l'œil puis en histologie.

* Seconde étude : évaluation de la performance de 12 types d'implants dits non connectés et stimulables à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques et de l'imagerie corticale.

* Troisième étude : analyse de la performance de 20 types d'implants connectés stimulables sur un modèle dit « aiguë » par imagerie corticale. Ce modèle permet d'avoir une évaluation rapide de la performance des implants testés.

* Quatrième étude : analyse de la performance de 10 types d'implants connectés sur un modèle dit « chronique » plus proche des conditions physiologiques impliquant une bonne performance de l'implant dans la durée.

Ces études seront menées sur un modèle murin de rétinite pigmentaire couramment utilisé par la communauté scientifique (rat P23H) ainsi que sur des rats dits normaux. Dans chaque étude, chaque implant sera testé sur un groupe maximum de 15 rats ; soit un total de 930 animaux. Ce nombre tient compte des pertes dues aux aléas expérimentaux.

L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet ; la biocompatibilité d'un matériau ne peut être évaluée qu'*in situ* sur le vivant. De même, les questions de performances des implants ne peuvent être étudiées sur des modèles cellulaires *in vitro*. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les rats seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Ils bénéficieront d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse) selon les procédures expérimentales. Pour les procédures de chirurgies, la douleur sera

prévenue par administration d'opioïdes en pré et post opératoire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien-être.

10802 Au cours d'un crible de mutagenèse à l'éthyl nitroso-urée (ENU), nous avons mis en évidence cinq lignées de souris présentant un fort développement musculaire associé à des anomalies du squelette. Ces lignées murines ont été identifiées en utilisant un crible dit sensibilisé, c'est-à-dire que nous avons utilisé des souris présentant une mutation dans le gène de la myostatine, un puissant régulateur de la croissance musculaire, afin d'accentuer un éventuel phénotype musculaire associé à la mutation créée par le mutagène ENU.

Lors de l'embryogenèse, il existe une balance entre développement du tissu musculaire et de squelette et il y a été montré que certains gènes, dont la myostatine, régulent ces deux voies de développement. Ce projet se compose de deux parties :

- L'identification des gènes mutés dans chaque lignée. En effet, les mutations ENU apparaissent aléatoirement dans le génome et il est nécessaire de les identifier par cartographie génétique à partir de souris mutantes présentant un fond génétique mixte.

- L'analyse approfondie du phénotype d'intérêt : le développement musculo-squelettique.

Ce projet a pour but de caractériser de nouveaux gènes impliqués dans le développement musculo-squelettique et leur interaction avec un gène majeur de ces voies de régulation : la myostatine.

Pour chaque lignée murine ENU :

- 50 souris mutantes sur un fond génétique mixte (FVB/C57Bl6) sont nécessaires pour la partie cartographie génétique.

- L'analyse phénotypique se réalise parallèlement sur trois lots d'animaux :

- 40 mâles et 40 femelles homozygotes pour la mutation ENU

- 40 mâles et 40 femelles hétérozygotes pour mutation ENU

- 40 mâles et 40 femelles sauvages +/-

Ce projet utilise 290 souris par lignée, soit 1450 souris pour l'ensemble de l'étude. Cette analyse comporte un suivi hebdomadaire de la croissance et de la masse corporelle du sevrage jusqu'à un an des souris, des analyses histologiques, métaboliques et squelettiques.

Dans un souci de respect de la règle des 3R. Il s'agit d'analyser un phénotype complexe touchant différents organes qui nous ne pouvons pas modéliser avec l'utilisation de cultures cellulaires. Les animaux utilisés pour les prélèvements sanguins seront également utilisés pour les prélèvements post-mortem d'échantillons tissulaires. Les souris bénéficieront dans chaque cage d'un enrichissement de leur milieu (rouleau en carton, coton dentaire, morceau de bois). Les animaux seront en groupe pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement. Cela permet d'intervenir rapidement et de manière appropriée si un problème était constaté.

10803 De nos jours, l'idée que l'état de santé chez l'adulte est déterminé par des événements périnataux est de plus en plus grandissante. Une fenêtre dite « critique » apparaissant très tôt dans la vie apparaît sensible à de nombreux facteurs environnementaux, en particulier à l'exposition à des substances chimiques qui contribueraient à augmenter le risque de pathologies chez l'adulte. Parmi ces facteurs, le Bisphénol A (BPA), un œstrogène synthétique utilisé comme monomère pour la confection des plastiques polycarbonates et résines époxy des emballages alimentaires, dont les boîtes de conserve. L'exposition humaine est attestée par la présence de BPA dans les urines et le sang. De plus, du BPA d'origine maternelle a été identifié dans le sang ombilical, le fluide amniotique, les tissus fœtaux et le lait maternel, témoignant de l'exposition du fœtus et du nouveau-né. Pour l'intestin, l'exposition fœtale chez le rat se traduit par une accumulation de BPA dans le méconium, alors que nos récents travaux ont établi que l'exposition périnatale à ce xénoestrogène fragilisait la fonction de barrière intestinale chez l'adulte, notamment la fonction immunitaire (réponse inflammatoire) et la perméabilité de l'épithélium intestinal.

Notre projet propose de comparer, pour différents bisphénols ou perturbateurs endocriniens, l'effet d'une administration par gavage (méthode par défaut utilisée pour tester les dangers des substances chimiques ingérées) en comparaison à l'administration cutanée (passage lent dans la circulation générale mimant une exposition transcutanée) sur une fonction cible du BPA préalablement identifiée : la réponse immunitaire systémique et locale à une dose efficace.

Le but de l'étude chez la souris est d'évaluer la toxicité du Bisphénol A et de ses substituts aux faibles doses, en période pré- et postnatale jusqu'à l'âge adulte, afin d'obtenir des données sur un modèle physiologique intégré, en partant d'une exposition depuis la vie fœtale. Il s'agit d'une problématique de santé, que seul un modèle intégré (ici la souris in-vivo) permet d'aborder dans sa complexité.

Les doses efficaces (ED50, dose efficace pour 50% de la populations) pour le BPA, BPS et BPF seront administrées chez la souris gestante et/ou allaitante pour étudier l'impact d'une exposition périnatale (voie orale et cutanée) sur la réponse immunitaire dans la descendance jeune (période péri-pubère) et à l'âge adulte. Le bisphénol A a été démontré comme provoquant des altérations de la tolérance immunitaire, nous avons pour hypothèse que les bisphénols pourraient précipiter ou aggraver la colite chez les souris génétiquement prédisposées. Dans le but de tester cette hypothèse, nous utiliserons des souris mutantes pour l'IL-10 qui développent spontanément une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI). Le but de l'étude chez la souris est d'évaluer la toxicité du Bisphénol A et de ses substituts, d'une part à l'âge adulte et d'autre part, en période pré- et postnatale jusqu'à l'âge adulte, afin d'obtenir des données sur un modèle physiologique intégré, en partant d'une exposition depuis la vie foetale. En effet, des études in vitro sur cellules intestinales sont inadaptées à cette fin, car ne reproduisent pas les phases de développement dans la transition fœtus/nouveau-né/puberté et susceptibles d'être perturbées par l'exposition pré- et postnatale aux bisphénols de différentes natures. Les études porteront sur 320 souris, calculé au plus juste pour permettre une analyse statistique précise des résultats obtenus, en application de la règle des 3R visant notamment à minimiser le nombre d'animaux par groupe et à assurer le bien-être animal et le raffinement, pris en compte notamment par la mise en place d'un enrichissement des cages des femelles pendant la gestation (complément de nidification). Le protocole principal de traitement aux agents bisphénols (par sonde gastro-œsophagienne ou exposition sous-cutanée) n'induit pas de souffrance chez l'animal. Il n'y aura aucune répercussion clinique (diarrhée, hémorragie digestive) pour les animaux.

10804 Les nerfs périphériques sont le lien essentiel entre le système nerveux central et les membres. Derniers effecteurs de la motricité, ils permettent aussi la transmission des informations sensibles vers le cerveau. Leurs lésions vont produire une atteinte sensitivo-motrice pouvant conduire à une amyotrophie et une anesthésie irréversible, sources de handicap permanent chez des patients souvent jeunes. Le traitement repose sur les sutures microchirurgicales en cas de section et la levée de l'origine de la compression quand cela est possible. Il existe ensuite une régénération axonale spontanée souvent trop lente pour permettre une guérison sans séquelles. Les études neurophysiologiques nécessitent l'utilisation d'animaux vivants. Pour étudier les mécanismes impliqués et moduler la régénération axonale, notre équipe a développé un modèle préclinique de lésion nerveuse périphérique chez le rat.

Dans le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement), nous utiliserons un nombre adéquat d'animaux (400 au total pour l'étude) pour satisfaire les exigences statistiques, afin d'évaluer la récupération fonctionnelle motrice chez le rat. A la levée de l'anesthésie générale, afin de réduire la douleur et le stress post-opératoires provoqués par l'expérimentation, les animaux seront suivis quotidiennement et une analgésie efficace administrée. Nous utiliserons des activateurs indolores pharmacologiques et non-pharmacologiques administrés de manière non invasive pour accélérer la régénération axonale. Ce projet permettra de mettre au point des protocoles thérapeutiques innovants et non-invasifs de la prévention de l'amyotrophie et des douleurs consécutives à une lésion nerveuse périphérique.

10805 La demande croissante par les citoyens et les organisations environnementales d'une législation concernant les usages de l'eau et la réduction des pollutions est liée à une prise de conscience grandissante de la valeur des écosystèmes en tant que système d'alerte précoce pour la santé de l'Homme. Ainsi, les perturbateurs endocriniens (PE), fortement retrouvés dans l'environnement, sont inscrits dans la liste des substances soumises à autorisation dans REACH de par leur activité à la fois sur la santé humaine et environnementale. En 2002, l'organisation mondiale de la santé a défini un PE comme toute substance ou mélange de substances étrangère(s) à l'organisme qui produit des effets délétères sur l'organisme, sa descendance ou les (sous-)populations, à la suite d'une modification de la fonction hormonale. Chez les poissons téléostéens, les PE sont principalement connus pour induire des effets sur la reproduction et la fonction endocrinienne. Cependant, certaines études tendent à démontrer également des effets sur la réponse immunitaire, notamment sur l'immunité innée et sur l'inflammation. Il a été principalement mis en exergue des augmentations du stress oxydant, de la production de cytokines pro-inflammatoires et une réduction de la flambée oxydative. Or, du fait de son importance dans la résistance vis-à-vis des maladies, le système immunitaire revêt une pertinence écologique forte. Ainsi, une déstabilisation des paramètres immunitaires par les PE pourrait expliquer en partie la sensibilité des organismes aux pathogènes. En effet, les PE peuvent interagir avec les récepteurs nucléaires stéroïdiens présents au niveau des leucocytes et des organes lymphoïdes modifiant ainsi la transcription des gènes de l'immunité.

Afin d'obtenir une vision plus élargie de l'effet des PE chez les poissons dulçaquicoles, nous proposons d'étudier les effets d'une exposition chimique à des PE sur l'altération des réponses immunitaires innées (distribution leucocytaire, mortalité cellulaire, efficacité et capacité de phagocytose, flambée oxydative, présence en lysosome) et inflammatoires (TNF- α , IL1b, Nf-kb, activité du complément), des enzymes de biotransformation et du stress oxydant. Afin de comprendre plus finement les effets toxiques des substances, un modèle PBTK-TD, basé sur les concentrations mesurées dans les différents organes, sera développé, permettant d'intégrer les différentes variables de l'exposition et de définir les variations dans le temps d'une dosimétrie à laquelle sont mécaniquement reliées les réponses mesurées. Enfin, dans une optique de vision sur le long terme pour les populations naturelles, l'effet transgénérationnel et l'effet sur la dynamique des populations seront également recherchés par l'intermédiaire d'étude en mésocosme.

Dans le cadre de cette étude, l'épinoche à trois-épines est utilisée du fait de sa large utilisation en analyse du risque environnemental et de sa présence dans les rivières françaises et européennes. En lien avec les 3R, nous nous basons sur des organismes vivants afin de prendre en compte l'intégralité des réponses physiologiques tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux nécessaire (5100 épinoches) pour obtenir une significativité des résultats (test de puissance). Enfin, dans le cadre du raffinement, les animaux vont bénéficier d'une eau adaptée en termes de paramètres physico-chimiques et d'une période d'acclimatation suffisamment longue pour limiter le stress dû aux expérimentations. Au cours de ce projet, toutes les expérimentations sont en accord avec la Directive 2010/63/EU, qui s'intéresse à la protection et au bien-être des animaux utilisés à des fins scientifiques, pour le maintien et l'utilisation des animaux en laboratoire.

10806 L'uretère est une structure permettant le passage de l'urine du rein vers la vessie, où l'urine est stockée entre deux mictions. L'urine est transportée dans l'uretère sous l'influence de la pression hydrostatique aidée par la contraction des muscles compris dans l'épaisseur de l'uretère. Certaines personnes souffrent de malformations congénitales de la jonction entre l'uretère et le rein (appelé jonction pyélo-urétérale) provoquant un rétrécissement de l'uretère proximal (près du rein) qui bloque l'écoulement de l'urine produite par le rein vers la vessie au travers de l'uretère. De là découle une dilatation du bassinet et des calices rénaux pouvant aboutir à une souffrance rénale. Le traitement du syndrome de la jonction pyélo-urétérale est chirurgical ; il consiste en la résection de la zone rétrécie et la suture au rein de la partie restante de l'uretère pour recréer la jonction entre le rein et l'uretère et rétablir l'écoulement de l'urine du rein vers la vessie. Le chirurgien pose aussi une sonde urétérale (endo-prothèse également appelée stent) entre le rein et la vessie pour permettre à l'urine de s'écouler tout en préservant la zone de suture le temps de la cicatrisation : le

stent limite le risque que le diamètre interne de l'uretère se referme du fait de la cicatrisation. Cette sonde sera retirée en consultation quelques semaines plus tard. Au besoin, le chirurgien peut ajouter un drain péri-rénal pour assurer le drainage de sang ou d'écoulement d'urine dans la zone opératoire.

Ce projet vise à l'évaluation préclinique sur le modèle porc d'un nouveau stent urétéral mis en œuvre lors d'une pyéloplastie réalisée par chirurgie ouverte chez l'enfant. Sa pose est réalisée par opératoire par voie percutanée. Ce nouveau stent se compose de plusieurs parties, dont une valve et un drain qui sont contrôlés en externe au niveau de la partie extracorporelle du dispositif équipé de connecteurs standard (poche de collection, injection de produits, drainage).

Ce nouveau dispositif présente plusieurs avantages par rapport aux techniques actuelles : la pose de la sonde se fait par voie endoscopique (mini-invasive) et son retrait est réalisé par simple traction sans anesthésie ni soin particulier. La sonde est courte et ne descend pas dans la vessie ce qui limite les risques d'infection et d'inconfort pour le patient opéré. Le système de valve dissocié permet de contrôler l'anastomose chirurgicale par injection ciblée de produit de contraste.

Le projet nécessite l'utilisation de 10 animaux. Afin de réduire leur nombre au mieux, nous n'incluons dans un premier que trois animaux afin d'avoir des premières données à analyser. En fonction de cette première analyse, nous améliorerons le dispositif si nécessaire et déciderons de la poursuite ou de l'arrêt de l'expérimentation animale.

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

Remplacement : Pour tester la sécurité et l'efficacité (temps de procédure, complications) du dispositif chirurgical en phase préclinique, le recours à l'animal vivant est nécessaire. Le porc est un modèle de choix, par sa taille, permettant d'utiliser des dispositifs de chirurgie conçus pour un usage chez l'enfant.

Réduction : Il s'agit d'une étude pilote et il n'y a pas de bases statistiques pour définir le nombre d'animaux. Le nombre de procédures chirurgicales réalisées sur chaque animal et le nombre d'animaux utilisés ont été optimisés pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés et obtenir des résultats significatifs. Dans le respect du principe de réduction, et sur la base de notre expérience dans le développement de nouvelles procédures, nous estimons que 10 animaux représentent un nombre nécessaire et suffisant.

Raffinement : Le projet prévoit des procédures chirurgicales réalisées sous anesthésie générale avec contrôle de la douleur per et post opératoire les animaux recevront un protocole de soins post-opératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des antalgiques, des antibiotiques et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés.

Les animaux seront euthanasiés après évaluation des complications post opératoires et la qualité de la chirurgie sans réveil pour ne pas engendrer de souffrances animales.

10807 Au cours de son développement, le lymphocyte B va subir une série de réarrangements géniques au niveau des locus codant les immunoglobulines (IgH pour les chaînes lourdes, IgL pour les chaînes légères Kappa et Lambda) visant à obtenir un répertoire hautement diversifié. Lors de la phase précoce de l'ontogénie B, les réarrangements VDJ permettent de générer un premier répertoire d'immunoglobulines (Ig) indépendamment de l'antigène. Lors des phases tardives, le lymphocyte B subira les mécanismes dit de diversification secondaire, la commutation isotypique (CSR, pour class switch recombination) et l'hypermutation somatique (SHM pour somatic hypermutation). Ces mécanismes ont respectivement pour but de modifier les fonctions effectrices et la spécificité antigéniques des Ig, afin d'optimiser une réponse immune. La CSR correspond à une recombinaison entre la région switch (S) donneuse S_μ et une région switch acceptrice située en amont d'un gène codant pour la partie constante (C) d'un autre isotype. Ce mécanisme induit la délétion du fragment situé entre ces deux régions S et l'expression d'une Ig d'isotype différent. AID a la capacité de cibler des régions "switch like" (LS) située dans la région régulatrice en 3' du locus IgH (3'RR), localisée en aval des exons constants. Une recombinaison entre la région S_μ et une de ces régions LS conduit à la délétion de l'intégralité des gènes C, rendant impossible l'expression du

récepteur BCR à la membrane de la cellule B, provoquant ainsi sa mort par apoptose. Ce mécanisme a été nommé LSR, pour locus suicide recombination.

L'apoptose rapide induite par la LSR la rend particulièrement difficile à étudier. Il reste encore notamment à déterminer comment et pourquoi ce mécanisme peut être induit dans certains lymphocytes B.

Nous avons créé un nouveau modèle murin qui permet la survie des cellules qui ont subi la LSR et donc son étude. L'objectif du présent projet est d'étudier la LSR dans différentes situations de stimulations du système immunitaire, en particulier :

- Quantifier la fréquence de la LSR,
- Identifier ses mécanismes de régulation,
- Déterminer quelles sont les caractéristiques communes des cellules subissant la LSR,
- Etudier l'implication potentielle de la LSR dans des pathologies immunes.

Ce projet utilise au total 320 souris.

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

Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier qui met en jeu des interactions entre plusieurs types de cellules et dans plusieurs organes.

Réduire : le nombre d'animal utilisé par expérience tient compte de la rareté de la LSR et ne peut pas être diminué sans prendre le risque d'avoir des résultats inexploitable sur le plan statistique.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. Les souris sont surveillées quotidiennement par du personnel qualifié pour détecter le moindre signe de souffrance. L'apparition d'un de ces signes constitue le point limite de l'expérimentation et entraînera la mise à mort de l'animal.

10808 Les organophosphorés (OPs) constituent une famille de molécules utilisées comme pesticides en agriculture et peuvent également être des armes chimiques. Ces OPs posent de graves problèmes de toxicité au niveau environnemental ainsi qu'aux populations civiles ou militaires exposées à de tels composés. Les séquelles d'une intoxication à ces composés sont graves, notamment neurologiques, pouvant conduire à la mort. On compte environ 25 000 cas mortels et 3 millions de cas d'intoxications sévères par an au niveau mondial. En cas d'empoisonnement par un OP, le traitement conventionnel médical d'urgence administré demeure relativement efficace pour traiter les effets à court terme sur les neurones mais inefficace pour les effets sur le système nerveux central du fait d'une capacité très limitée de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière physiologique est un filtre très sélectif de la circulation sanguine qui protège le cerveau des agents pathogènes et de certaines molécules toxiques. De plus, il n'existe aucun traitement pour contrecarrer les effets neurologiques à long terme induit par certains de ces composés OPs (neuropathie à effet retard induite par les OPs). Par ailleurs, un grand nombre d'OPs de structures chimiques différentes existe, ce qui complexifie la compréhension de leur mode d'action et donc la possibilité de trouver un traitement efficace générique. C'est dans ce contexte de problème de santé publique que nous proposons de développer un modèle animal alternatif pour comprendre le mode d'action de ces composés et pour identifier de nouveaux antidotes efficaces pour lutter contre les effets délétères de ces molécules toxiques. La découverte de nouveaux médicaments peut nécessiter l'utilisation d'un modèle animal pour la modélisation de la pathologie induite par l'exposition à des molécules toxiques et pour l'identification et la validation dans un modèle *in vivo* complexe d'antidotes nouveaux à proposer pour des études cliniques. La larve du poisson zèbre âgée de sept jours après la fécondation (jaf) est le modèle retenu pour notre projet. A ce stade de développement, la BHE est mise en place et les fonctions biologiques ainsi que les acteurs moléculaires qui sont ciblés par les OPs dans l'espèce humaine sont conservés chez le poisson zèbre. Ce modèle possède de nombreux avantages, comme par exemple un élevage peu onéreux

et facile, la petite taille des larves et un suivi individuel possible d'un grand nombre d'animaux simultanément pour des tests locomoteurs.

D'un point de vue expérimental notre projet consiste à tester, à l'aide de différents tests biochimiques, locomoteurs et comportementaux sur des larves âgées de 7 jaf, les effets d'OPs seuls ou en combinaisons avec un antidote/molécule pharmacologique ou un cocktail d'antidotes. Le projet, d'une durée de trois ans, inclut au maximum 30 expérimentations par an comptant chacune en moyenne 600 larves, soit un total maximal de 54 000 larves sur l'ensemble du projet. Avec 600 larves par expérimentation, l'étude de huit conditions d'exposition en parallèle est rendue possible. Pour chaque condition d'exposition, entre 73 à 78 larves sont nécessaires pour effectuer les différents tests décrits dans les procédures expérimentales qui permettent d'évaluer l'efficacité des antidotes : 6 larves sont utilisées pour la détermination du phénotype locomoteur par la réponse motrice visuelle ; 6 larves pour la caractérisation de l'effet anxiolytique ; entre 10 à 15 larves pour la détermination du phénotype locomoteur par la réponse motrice induite par stimulation électrique ; et 51 larves pour les tests enzymatiques. Dans le cas de la mesure de l'anxiété, les larves enrôlées dans l'étude du phénotype locomoteur seront également utilisées pour effectuer une évaluation de l'anxiété minimisant ainsi le nombre d'animaux utilisés pour le projet de recherche. (3R : Réduction)

Les procédures expérimentales mises en œuvre s'effectueront au plus proche des conditions physiologiques de vie de l'animal avec des enceintes et eau chauffées à 28°C (3R : Raffinement). Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans le projet et de minimiser les effets délétères des molécules testées, le degré de toxicité éventuel des molécules utilisées sera mesuré au préalable par exposition de larves non autonomes âgées de 4 jaf et de ce fait non soumises aux règles de l'expérimentation animale selon la directive européenne 2010/63/EU. (3R : Réduction) Les concentrations non létales et qui conservent l'intégrité physique des animaux seront alors utilisées à 7 jaf pour l'évaluation biochimique, locomotrice et comportementale avec des animaux qui présentent une BHE mise en place. A la fin de l'expérimentation, les larves contaminées par les molécules toxiques et ayant été enrôlées dans les tests locomoteurs et comportementaux seront euthanasiées par sédation profonde puis congélation. Seul les analyses biochimiques seront réalisées sur animaux après congélation instantanée dans l'azote liquide (-195°C). Les animaux contrôles seront conservés afin d'augmenter le nombre d'animaux en élevage pour la reproduction au sein dans notre animalerie agréée. Dans nos procédures, le respect de la règle des 3R est également mis en œuvre par la réduction du nombre d'animaux utilisés pour les tests locomoteurs et comportementaux du fait du suivi individuel de l'animal. Ceci engendre un grand nombre de données individuelles permettant de limiter le nombre de réplifications des expérimentations grâce à une statistique utilisant l'appariement des données. (3R : Réduction)

Certaines des molécules utilisées dans nos travaux peuvent avoir été déjà approuvées par l'Agence Européenne des Médicaments (AEM). S'il s'agit d'un repositionnement thérapeutique, ces molécules peuvent donc être enrôlées dans des essais cliniques sans être à nouveau validées sur un modèle mammifère. La larve de poisson-zèbre peut alors être considérée comme un accélérateur de découverte d'antidotes sans nécessité d'utiliser l'expérimentation animale sur mammifères. (3R : Remplacement)

10809 Ce projet a pour but d'évaluer le potentiel thérapeutique des greffes d'organoïdes neuraux pour le traitement de la maladie de Parkinson.

La maladie de Parkinson est une maladie du cerveau qui se traduit par des troubles moteurs dus à la mort progressive et accélérée de cellules appelées neurones dopaminergiques dans une région précise du cerveau : la substance noire. Ces neurones localisés dans la substance noire envoient des projections vers le striatum (autre région du cerveau spécialisée dans la fonction motrice).

Une des approches thérapeutiques expérimentales de la maladie de Parkinson consiste à greffer des neurones fœtaux dopaminergiques dans la substance noire. Chez les patients parkinsoniens, des essais cliniques de transplantation de neuroblastes provenant de fœtus humains ont abouti à certaines améliorations motrices, mais n'ont pas encore atteint un niveau justifiant leur utilisation en routine. Un des problèmes importants de greffe de neurones est le faible taux de survie de neurones greffés, l'objectif de notre projet est d'utiliser des neurones dopaminergiques encapsulé

(organoïdes) afin d'augmenter la survie des neurones greffés. Ce projet est un projet collaboratif où notre équipe va réaliser la transplantation de ces organoïdes dans un modèle de rat parkinsonien. Un protocole complet nécessite l'utilisation de 40 animaux. La règle des 3R a été prise en considération. De nos jours, il n'est pas encore possible de modéliser un cerveau de mammifère *in vitro*, qui nous permettrait d'étudier la transplantation et donc de remplacer cette étude par des expériences *in vitro*. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique. Enfin, la notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation qui sont optimisées (sédation et analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales.

10810 Le cannabis est depuis longtemps connu pour ses effets thérapeutiques mais son utilisation est limitée par les effets psychoactifs du tétrahydrocannabinol majoritairement présent dans la plante. Néanmoins, d'autres composés phytocannabinoides pourraient avoir une utilisation thérapeutique dans différentes pathologies, notamment le syndrome de l'X fragile. En effet, des données récentes suggèrent l'implication du système endocannabinoïde dans l'étiologie du syndrome de l'X fragile. L'objectif de ce travail est d'évaluer le potentiel thérapeutique de ces molécules dans un modèle murin du FXS.

Nous avons largement contribué à la caractérisation de ce modèle sur le plan comportemental à la fois au niveau moteur, émotionnel, cognitif et social et nous pensons qu'il constitue un excellent modèle pour évaluer les potentiels effets thérapeutiques des phytocannabinoides.

Cette étude a donc pour objectif d'étudier l'impact des phytocannabinoides sur le phénotype comportemental des souris. Le traitement sera réalisé chez des souris adultes chez lesquelles les perturbations sont installées depuis longtemps et chez des souris au sevrage chez lesquelles les troubles comportementaux sont en train de se développer.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, les mêmes animaux seront utilisés pour l'ensemble des tests de chaque expérience. Néanmoins, seule l'utilisation d'animaux est possible lorsque l'on veut étudier les effets comportementaux liés à une pathologie et à l'action de molécules susceptibles d'atténuer les perturbations comportementales. Étant donné la variabilité interindividuelle existant dans le comportement des souris un effectif par groupe de 12 animaux au moins est nécessaire. Deux doses seront étudiées simultanément pour n'avoir qu'un seul groupe contrôle. Un total de 246 animaux est nécessaire à la réalisation de cette étude comprenant les animaux expérimentaux et les congénères des tests sociaux.

Afin de limiter au maximum le stress des animaux, une habituation à l'expérimentateur par manipulation quotidienne légère est réalisée. Un seul expérimentateur manipule les animaux pendant toute la durée de l'expérience. Aucun des tests comportementaux n'est invasif, douloureux ou ne nécessite de privation alimentaire ou hydrique. Néanmoins, les animaux sont habitués à la pièce expérimentale et au dispositif. Tout ceci diminue le stress des animaux et améliore la fiabilité des tests comportementaux.

10811 Les sarcomes des tissus mous représentent un groupe hétérogène de tumeurs. On estime entre 3 000 et 4 000 le nombre de nouveaux cas annuels. La rareté des modèles précliniques dans cette pathologie fait que peu de traitements sont disponibles, le décès survenant ainsi dans près de 50% des cas. Le développement de modèles précliniques pour l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques représente donc un enjeu crucial. Nous sommes localisés dans un centre de référence dans le traitement de ce cancer rare et avons mis en place une plateforme préclinique basée sur des lignées cellulaires développées à partir de tumeur de patients. Nous pouvons ainsi étudier *in vitro* les effets biologiques et pharmacologiques de molécules en développement. Des résultats préliminaires ont montré l'importance de la population de cellules dites « souches » dans la prise de greffe et dans la résistance aux traitements anti-cancéreux. Cependant, les modèles cellulaires *in vitro* restent limités et il est nécessaire de développer des modèles d'études *in vivo*

afin de pouvoir évaluer l'efficacité de ces nouveaux traitements potentiels avant de pouvoir réaliser les essais chez l'homme.

Dans ce contexte, nous souhaitons

1/ tester la prise de greffe chez des souris immunodéficientes de nos 20 lignées cellulaires de sarcomes établies et caractérisées.

2/ évaluer l'efficacité d'une nouvelle thérapie ciblée : l'EPZ (un inhibiteur impliqué notamment dans le maintien des cellules souches) sur la prolifération tumorale de nos lignées cellulaires *in vivo*, seul ou en combinaison avec des chimiothérapies classiques utilisées dans le traitement des sarcomes,

3/ évaluer la prise de greffe de cellules « souches » préalablement isolées à partir de nos lignées cancéreuses et tester l'efficacité de l'EPZ sur la prolifération tumorale de ces cellules souches cancéreuses.

Pour réaliser ce projet, nous estimons avoir besoin de 365 souris immunodéficientes sur 2 ans.

Dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Nous avons étudié les effets biologiques et pharmacologiques de nombreuses nouvelles molécules en développement sur des lignées de sarcomes *in vitro*. Nous souhaitons dorénavant étendre ces études à un modèle plus complet qu'est le petit animal. En effet, l'oncogenèse est un modèle intégré qui fait intervenir un grand nombre de mécanismes physiologiques et de tissus avoisinants qui ne peuvent être modélisés *in vitro*. Nous devons donc avoir recours à un modèle physiologique complet et fonctionnel.

Réduction : Nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. Les cellules greffées posséderont un marqueur luminescent ce qui permettra de suivre la croissance tumorale toute au long de l'expérience et ainsi réduire le nombre d'animaux.

Raffinement : Le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort, les animaux seront hébergés en groupe et l'enrichissement de leur milieu de vie sera systématique. Les animaux recevront une surveillance quotidienne et des soins adaptés (administration d'analgésiques et anesthésiques en pré et/ou post-opératoire, mesure hebdomadaire du poids des souris et du volume tumoral, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt).

10812 Dans le cadre des enseignements de microbiologie (immunologie et parasitologie) de la Faculté de Pharmacie, nous utilisons des animaux vigiles pour les travaux pratiques. Les travaux pratiques sur souris permettent de mettre en évidence pour les travaux pratiques de parasitologie la multiplication parasitaire d'une souche de trypanosome ce qui permet à l'étudiant d'appréhender les techniques de biologie médicale comme les frottis sanguins. Pour les travaux pratiques d'immunologie, les étudiants apprennent à isoler des cellules primaires et effectuer une numération et un test de viabilité.

Chaque année les travaux pratiques de parasitologie nécessite 51 souris chez lesquelles le parasite est inoculé. Avant le pic parasitaire du sang est prélevé à l'extrémité de la queue de l'animal (quelques microlitres). Par la suite les animaux sont euthanasiés selon les procédures en vigueur au sein de l'animalerie (CO₂) par les personnels qualifiés. La charge parasitaire entre le moment de l'inoculation et les travaux pratiques est suivie quotidiennement afin que les animaux ne souffrent pas. Les souris sont réparties par lot et le nombre de souris par lot est réduit à 6 animaux.

Chaque année les travaux pratiques d'immunologie nécessite environ 80 souris selon le nombre d'étudiants par année. En raison de l'interdiction de manipuler les produits sanguins humains, et dans l'intérêt d'apprendre à travailler sur un mélange de populations cellulaires, les rates des souris sont prélevées après euthanasie selon les procédures en vigueur (CO₂). Il n'y a pas de degré des souffrances car les animaux sont euthanasiés avant l'expérimentation par les personnels qualifiés.

Ce projet utilise au total 131 souris/an soit 655 pour 5 ans et répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacer : Le choix des animaux vivants pour les TP d'immunologie relève de l'impossibilité de travailler sur du sang humain, ce qui justifie un modèle animal vigile car les étudiants du secteur seront amenés à travailler dans les métiers de la santé pharmaceutique et c'est la seule alternative

à une initiation à la manipulation d'éléments biologiques sanguins. Pour les TP de parasitologie ce choix est aussi fonction de la souche de Trypanosome à disposition au laboratoire (compatibilité parasite/hôte).

Réduire : Pour ces travaux pratiques, les souris utilisées sont issues d'expérimentation. Il s'agit de contrôles sains destinés à l'euthanasie afin de rationaliser les effectifs animaux utilisés. Dans un souci de rationalisation des animaux le stade de développement ni la race de souris n'a pas d'importance (les souris ont au moins 12 semaines). Ceci conduit à une réduction du nombre d'animaux générés dans l'élevage. Pour les TP de parasitologie, 6 souris sont utilisées pour chaque groupe (il y a 4 groupes) donc environ 1 souris pour 3 étudiants au lieu d'une souris par étudiant ce qui diminue le nombre de souris nécessaire.

Raffiner : Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement conventionnel (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux, la séparation des souris qui se battent et l'euthanasie des souris blessées) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux. Les souris qui atteignent le point limite (léthargie, difficultés respiratoires, diminution d'activité) seront immédiatement euthanasiées.

10813 L'objectif de nos travaux dans un contexte de santé globale (une seule santé pour les animaux et les humains) est de comprendre la circulation des génotypes du parasite *Toxoplasma gondii* (toxoplasme), dans différents biotopes (domestique et sauvage) afin de mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie transmise par ce parasite : la toxoplasmose. Pour cela, il faudra isoler des souches de toxoplasme par passage par la souris, au sein du laboratoire, afin de pouvoir réaliser dans un second temps la caractérisation génétique des souches isolées. Le passage en modèle murin, en plus de l'isolement de la souche permet d'amplifier la charge parasitaire afin d'obtenir des quantités de parasite suffisantes pour cette caractérisation génétique qui est rarement possible sur les prélèvements environnementaux initiaux du fait de la faible charge parasitaire. Les isollements de toxoplasmes se feront essentiellement à partir d'animaux domestiques et d'élevage (ex : poulets, chèvres, moutons) et d'animaux sauvages (ex : rongeurs, oiseaux, voire grands mammifères) trouvés préalablement morts (échantillonnages opportunistes : animaux euthanasiés provenant de refuges ou de fourrières, animaux d'élevages traditionnels consommés, sous-produit de la chasse autorisée, refuge de la faune sauvage, animaux renversés en bord de route). Une sérologie sera d'abord pratiquée sur ces animaux au moment de leur abattage ou sur carcasse concernant les animaux préalablement trouvé mort. En cas de résultat positif, le cerveau et/ou le cœur de ces animaux seront récupérés, broyés et digérés puis inoculés à la souris pour isolement. En cas d'isolement de souches, celles-ci seront caractérisées génétiquement et ces résultats seront analysés en termes de génétique des populations afin de mieux comprendre la circulation du parasite dans l'environnement et donc in fine les sources de contamination chez l'humain. Les souches isolées seront pour la plupart confiées à un centre hospitalier à des fins de cryoconservation et de distribution aux chercheurs. Ce projet utilisera au total un maximum de 2100 souris de laboratoire sur une durée totale de 5 ans.

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

Remplacer : La culture cellulaire est possible pour le toxoplasme, mais elle est de moindre sensibilité que l'inoculation à la souris. Pour cette raison, elle a été abandonnée par tous les laboratoires de Parasitologie dans un cadre de diagnostic de la toxoplasmose humaine. De plus la source environnementale des prélèvements initiaux dans le cadre de notre projet est souvent source de contaminants pour la culture cellulaire (champignons, bactéries, virus...) que le modèle animal permet d'éliminer. Pour toutes ces raisons le recours à l'animal est nécessaire pour atteindre les objectifs du projet.

Réduire : Sur le versant humain de la toxoplasmose, le nombre d'animaux indiqué par la nomenclature des actes de biologie médicale est de 6 souris par produit pathologique inoculé. Notre expérience nous a permis de réduire ce nombre à 3 souris sans nuire à la réussite d'isolement des souches à partir de prélèvement d'animaux. Par ailleurs, seuls les organes les plus susceptibles

d'être infectés, après analyse sont inoculés (cœur, cerveau.). Cette stratégie de réduction est également appliquée pour les prélèvements d'origine animale. Dans les rares cas où l'expérimentation induit une souffrance, la fréquence d'observation est accentuée et les animaux sont euthanasiés dès l'apparition des premiers signes de souffrance.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau à volonté, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (traitement antibiotique des prélèvements inoculés au souris afin d'anticiper toute surinfection de ces dernières, analgésiques post traitement si nécessaire, anesthésie lors des prélèvements, traitement antiparasitaire dans les très rares cas de souches parasitaires virulentes pour limiter l'infection chez la souris).

10814 La mandibule, os formant la mâchoire inférieure, a un rôle primordial dans la mastication. Il participe également à l'élocution et a un rôle esthétique dans l'aspect et la projection du tiers inférieur de la face. Les pertes de substance au niveau de cet os sont majoritairement d'origine traumatique ou tumorale. Elles peuvent aussi être la conséquence d'une infection, d'un traitement par radiothérapie, chimiothérapie ou de l'utilisation de bisphosphonates. Lorsque la portion osseuse manquante est trop grande, elle ne peut se reconstituer spontanément et nécessite d'être reconstruite. La reconstruction de ces pertes de substance est un challenge sur le plan fonctionnel et esthétique. Le traitement de référence repose actuellement sur la réalisation d'un lambeau libre, c'est-à-dire le transfert d'os et de tissus mous vascularisés d'une zone donneuse (le plus souvent la jambe ou l'avant-bras), vers une zone receveuse à reconstruire (la mandibule). Il s'agit d'une chirurgie lourde, durant plusieurs heures et techniquement complexe (microchirurgie). Elle implique des séquelles au niveau de la zone donneuse. En cas d'échec, des complications parfois graves peuvent survenir au niveau du site receveur, avec la perte de la reconstruction, principalement liée à la taille des vaisseaux utilisés (de l'ordre du millimètre). Elles peuvent mettre en danger la vie du patient, d'autant plus que les patients nécessitant cette procédure ont souvent un état de santé fragile. Il est nécessaire de trouver des techniques moins complexes et plus sûres. L'objectif de cette étude est de trouver une alternative au lambeau libre pour reconstruire les pertes de substances mandibulaires.

Nous souhaitons utiliser des fragments d'aorte congelés pour remplacer l'os manquant. Cette technique a déjà été utilisée en chirurgie thoracique où elle a permis de remplacer la trachée, et en chirurgie digestive pour remplacer l'intestin grêle.

Pour cette étude, nous souhaitons utiliser le lapin, modèle animal déjà largement utilisé en cancérologie.

Les aortes utilisées seront collectées préalablement sur des lapins destinés à la création d'anticorps, récupérés immédiatement après leur euthanasie. Ces aortes seront ensuite cryoconservées pour être réutilisées secondairement.

La mise en place de ce projet se fera dans le respect de la règle des 3R. Le nombre d'animaux sera réduit à son minimum pour obtenir des résultats extrapolables à la population cible. Nous pratiquerons la même intervention chirurgicale sur 15 lapins. Nous retirerons de chaque côté un fragment de la mandibule suffisamment grand (15 millimètres) pour ne pas pouvoir se reconstituer seul. A la place de cette perte de substance, nous mettrons en place une greffe osseuse entourée d'un fragment d'aorte du côté droit. A gauche, le défaut osseux sera manchonné par un fragment aortique seul.

La création de la perte de substance bilatérale et la reconstruction se feront dans le même temps opératoire pour éviter la répétition inutile d'actes invasifs sur les animaux. L'expérimentation animale se limitera aux seules procédures pour lesquelles il n'existe pas de méthode alternative. Nous prendrons les mesures nécessaires pour limiter la douleur et le stress chez les animaux. La portion reconstruite sera maintenue de chaque côté par une plaque en titane pour empêcher la mobilité de la mâchoire et ainsi diminuer la douleur post-opératoire. La procédure chirurgicale se

déroulera sous anesthésie générale. Les animaux recevront pendant et après la chirurgie un traitement antalgique adapté. Les conditions d'hébergement respecteront les normes en vigueur. L'alimentation sera adaptée les 10 premiers jours après l'intervention (humidifiée et molle) compte tenu de l'intervention sur la mâchoire. Pendant toute la durée de la surveillance, aucun acte invasif ne sera réalisé.

Un groupe de 5 animaux sera euthanasié au bout de 1 mois, un deuxième au bout de 3 mois et le dernier au bout de 6 mois. La mandibule reconstruite sera prélevée et analysée par un médecin anatomopathologiste pour évaluer la néoformation de tissu osseux au sein de ce tissu d'interposition. La génération de tissu osseux est un processus long, les analyses itératives à 1, 3 et 6 mois permettront de mettre en évidence les différentes étapes du processus d'ossification.

10815 Le parcours du Master doit être délivré suite à un enseignement théorique et pratique en lien avec l'étude des grandes fonctions physiologiques chez le mammifère et chez l'homme. L'acquisition des compétences requises nécessite un enseignement pratique dédié à l'expérimentation animale afin d'illustrer les concepts majeurs de la physiologie en conditions concrètes et réelles par l'application d'une méthodologie de type recherche scientifique en biologie.

Au-delà de l'acquisition de connaissances et de compétences propres à une formation scientifique initiale, les objectifs de ce parcours de Master correspondent à la poursuite d'études dans des doctorats de type biologie-santé impliquant une insertion professionnelle dans des laboratoires de recherche et développement de l'industrie pharmaceutique et des laboratoires de recherche académique qui nécessite des apprentissages en lien avec les problématiques de ces laboratoires. En conséquence, l'enregistrement de paramètres biologiques, l'expérimentation animale et la mise en évidence de régulations hormonales ainsi que d'activités pharmacologiques sont primordiales pour sensibiliser et instruire les étudiants aux pratiques des études précliniques obligatoires dans le développement d'une nouvelle

Molécule candidat-médicament. Afin d'atteindre ces objectifs de formation méthodologique et pratique, les études sont réalisées sur plusieurs séances réparties au premier semestre de la première année de Master.

La sécrétion salivaire est une fonction importante de la physiologie digestive et présente l'intérêt d'être mesurable de façon non invasive chez l'animal. Les différentes séances de travaux pratiques permettent aux étudiants de mettre en place sous la forme de projets encadrés des protocoles expérimentaux afin de mesurer et quantifier l'impact d'agents pharmacologiques sur la fonction de sécrétion salivaire. Afin de respecter la « Règle des 3 R » établie par Russel et Burch, les protocoles expérimentaux sont mis en place de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux (réduire). En effet, les étudiants se répartissent en groupe de 4 afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. En ce qui concerne le raffinement, qui consiste à optimiser l'expérience afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux, il est à noter que cette procédure est sans acte chirurgical et donc sans douleur post-opératoire. L'inconfort des animaux se résume majoritairement à la procédure de contention et d'anesthésie des animaux ainsi qu'aux traumatismes produits par les injections lorsque l'animal est anesthésié. Une grande attention est portée sur la profondeur de l'anesthésie par l'observation de mouvements et les tests de réponses à des stimuli mécaniques (points de contrôle) ainsi que du comportement de l'animal après son réveil. Selon le nombre d'étudiants, il est prévu d'utiliser au maximum 20 rats par année universitaire pour ce projet, soit un maximum de 100 rats pour 5 ans. Ce nombre est un compromis nécessaire pour répondre aux exigences de la formation en termes d'observation et de pratique technique en accord avec les obligations pédagogiques relatives au diplôme et pour satisfaire au critère de réduction du nombre des animaux en vigueur dans la règle des 3R.

Compte tenu des objectifs de la formation, il ne nous est pas possible de remplacer l'expérimentation animale par d'autres alternatives *in vitro* (remplacer).

10816 En France, les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité chez la femme et la seconde chez l'homme. En Europe, elles représentent la moitié des décès. Son expression la plus courante est la maladie coronarienne, responsable de l'angine de poitrine et de l'infarctus. L'infarctus entraîne une mort des cellules cardiaques irréversible en aval du thrombus dû à l'obstruction d'une artère privant le tissu d'oxygène et de nutriments. Pour remplacer le tissu mort, une cicatrice (fibrose) se met alors en place. Il en résulte une augmentation de la demande mécanique pour le cœur. Le projet propose de tester un nouveau médicament déjà utilisé en cancérologie pour diminuer la cicatrice post-infarctus du myocarde. L'effet de ce nouveau médicament sera comparé à un médicament de référence en cardiologie, des animaux avec chirurgie mais sans traitement, et des animaux contrôles pour qui la chirurgie sera mimé mais sans traitement.

Le projet durera 1 an et concernera 130 souris maximum, dès qu'un groupe sera validé il ne sera pas nécessaire de continuer. Malgré de nombreuses études *in vitro* et des stratégies de remplacement mises en place, ces dernières ne peuvent pas remplacer l'organisme entier en raison de l'isolement des cellules du contexte physiologique. Nous travaillerons donc sur un modèle murin car chez la souris, le développement et le fonctionnement physiologique du cœur sont similaires à ceux décrits chez l'Homme. Les animaux seront dans un environnement contrôlé (température, cycle jour/nuit, alimentation et boisson *ad libitum*), et enrichi afin de les stimuler. Les souris seront traitées avec des anti-douleurs et anesthésiées pour toute procédure chirurgicale dans une situation similaire à celle utilisée pour des patients humains. Elles seront suivies tous les jours du protocole de recherches.

Nous travaillerons avec des souris qui auront subi expérimentalement un infarctus du myocarde, un modèle utilisé fréquemment et décrit à de nombreuses reprises dans la littérature. Le projet se fera dans le respect de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer). Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. Malgré de nombreuses études *in vitro* et des stratégies de remplacement mises en place dans le projet, ces dernières ne peuvent pas remplacer l'organisme entier en raison de l'isolement des cellules du contexte physiologique. Pour leur bien-être, nous respecterons la réglementation européenne concernant la densité d'animaux par cage (5 par cage). Dans la mesure du possible, les souris seront plusieurs par cage afin de respecter leur instinct grégaire. Les animaux seront observés tous les jours, de leur arrivée à leur euthanasie. La planification des procédures expérimentales (disponibilité des locaux d'expérimentation, du matériel, période d'acclimatation des animaux aux pièces d'expérimentation) diminue le stress des animaux et favorise la validité de

L'expérience. Nous avons établi des points limites les plus précoces possibles en fonction de l'objectif de l'expérimentation.

10817 L'exploration fonctionnelle et l'imagerie *in vivo* sont des outils de plus en plus développés dans l'appui à la recherche biomédicale sur les animaux utilisés à des fins d'expérimentation animale. Ces techniques permettent de réaliser le suivi de paramètres anatomiques et physiologiques d'un même animal au cours du temps sans impliquer d'anxiété et de douleurs supplémentaires car réalisés sous anesthésie générale gazeuse et avec très peu de procédures invasives. Ces méthodes participent à la réduction du nombre d'animaux d'expérimentation animales et au raffinement de leurs conditions de vie car pouvant se substituer à des procédures de gravités plus sévères, plus douloureuses et nécessitant un nombre d'animaux plus important. Elles permettent également de renforcer la pertinence scientifique, le même animal étant son propre témoin tout au long de l'étude.

C'est pourquoi, nous proposons aux étudiants de masters, des travaux pratiques pour découvrir différentes techniques d'imagerie tels que l'échographie, l'imagerie isotopique et l'imagerie par résonance magnétique ; ainsi que d'exploration fonctionnelle comme l'enregistrement et l'analyse d'électrocardiogramme (ECG). Nous montrons également la réalisation d'un modèle de pathologie cardiaque (anévrisme de l'aorte abdominale) réalisé sous anesthésie gazeuse et avec injection en pré-opération d'analgésique, qui permet à des équipes de recherche de développer de nouvelles approches diagnostiques pour être appliquées ensuite chez l'homme. L'anesthésie et l'analgésie seront adaptées afin de n'induire aucune souffrance inutile. Les animaux seront hébergés selon les

normes en cours, et nous veillons à la bonne qualité des soins et à leur bien-être avant l'expérimentation. Ces travaux pratiques sont également l'occasion de rappeler les règles de bonnes manipulations des rongeurs et des règles d'éthiques.

Le remplacement ne peut s'appliquer dans ce projet car les techniques que nous montrons sont exclusivement dédiées aux rongeurs avec des systèmes adaptés à leur taille.

Nous prévoyons dans ce projet d'utiliser 13 animaux par an, soit 1 animal par créneau de travaux pratiques (6 souris swiss et 7 rats wistar), soit 65 animaux sur 5 ans et de faire découvrir aux étudiants ces modalités dans le cadre de travaux pratiques incluent dans leur formation de master. Le domaine d'application sera essentiellement cardiaque au vu des compétences développées localement. Nous réduirons le nombre d'animaux en utilisant le minimum d'animaux, adapté aux nombres d'étudiants. Dans la mesure du possible, les animaux réformés provenant d'autres projets et n'ayant subi aucune procédure seront prioritairement utilisés. Ils seront ensuite euthanasiés en fin de travaux pratiques.

10818 Le développement de nanoparticules pour la délivrance de médicaments ou d'agents d'imagerie dans le contexte de la nanomédecine rencontre un intérêt croissant. Dans ce contexte, une étroite collaboration établie avec des équipes de chimistes nous amènent à valider, par imagerie *in vivo*, différentes formulations de nanoparticules afin d'une part d'imager leur biodistribution et d'autre part de mesurer leurs performances diagnostiques. Avant d'envisager une étude chez l'animal, l'absence de toxicité des nanoparticules sera vérifiée. Nous travaillerons avec des souris qui auront une tumeur sous cutanée. Cette tumeur sera obtenue après l'injection de cellules cancéreuses génétiquement modifiées sous la peau.

La demande des chimistes étant de plus en plus importante, nous prévoyons de tester une dizaine de nanoparticules par an, à raison de 6 souris par lots, soit 60 souris par an. Le projet étant sur 5 ans, soit un total de 300 souris.

L'utilisation des animaux est indispensable pour reproduire les mécanismes complexes liés aux tumeurs et il n'y a pas d'autres alternatives pour étudier la bio distribution d'une molécule. Seules les nanoparticules ayant un réel intérêt seront testées chez l'animal. Les techniques d'imagerie que nous utilisons sont non invasives et permettent de réaliser un suivi dans le temps sur un même animal, ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés au final. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et un enrichissement du milieu est fourni par l'animalerie. Toutes les procédures sont réalisées sur animal anesthésié et lors de l'anesthésie les animaux sont placés sur un tapis chauffant. Les animaux sont quotidiennement suivis par le personnel de l'animalerie en étroite collaboration avec l'expérimentateur. Au moindre signe de souffrance et/ou de mal être de l'animal l'expérimentation sera stoppée. Ces signes sont les suivants : nécrose de la tumeur, gêne occasionnée par la tumeur (dans le déplacement notamment), comportement anormal de l'animal (isolation, prostration, arrêt du toilettage).

10819 Wfikkn1 est une protéine à domaines multiples possédant une forte affinité avec la myostatine (Gdf8) et Gdf11, deux protéines essentielles dans la régulation du développement musculo-squelettique. De par ses domaines, Wfikkn1 a été identifiée comme des inhibiteurs de Gdf8 et Gdf11 et est exprimée dans de nombreux tissus, contrairement à la myostatine. Des expériences préliminaires ont montré qu'en traitant de façon transitoire une lignée cellulaire myoblastique murine avec de la protéine Wfikkn1, la prolifération et de la différenciation cellulaire étaient accélérées. Cependant, le rôle de Wfikkn1 dans les autres types cellulaires reste inconnu. Cette protéine a-t-elle d'autres partenaires et comment agit-elle ? Que ce soit en génétique humaine ou en agronomie, les inhibiteurs de la myostatine présentent un fort intérêt que ce soit pour des applications thérapeutiques associées à la sarcopénie, les myopathies par exemple ou pour des applications agronomiques pour rechercher un meilleur rendement de carcasse dans l'espèce bovine. Mais il est nécessaire de connaître leurs effets dans l'ensemble des tissus de l'organisme. Afin de mieux comprendre le rôle de Wfikkn1 dans l'organisme, ainsi que dans le développement musculo-squelettique, et les mécanismes moléculaires mis en jeu, nous disposons de quatre

modèles murins sur-exprimant cette protéine de façon ubiquitaire mais avec des niveaux d'expression différents entre ces lignées transgéniques.

Une première étude phénotypique va nous permettre de constater si les résultats obtenus ex-vivo sont similaires dans la lignée cellulaire myoblastique et dans un organisme entier, à savoir une augmentation de la prolifération et de la différenciation musculaire. Y-a-t-il un phénotype associé à cette surexpression dans un autre tissu de l'organisme ? De plus, sachant que *Wfikkn1* a été décrit comme un inhibiteur de *Gdf11*, une protéine impliquée dans le développement osseux, qu'en est-il au niveau squelettique ? Cette partie nécessitera l'utilisation de 20 mâles et 20 femelles pour chaque lignée ainsi que pour la lignée contrôle (souris sauvage de fond génétique FVB), soit un total de 200 souris. L'analyse en parallèle des quatre lignées transgéniques est indispensable. Ces lignées sont toutes génétiquement différentes, elles présentent des insertions aléatoires dans le génome du transgène d'intérêt avec des points d'insertions et un nombre de transgènes différents entre ces quatre lignées. Il n'est possible de conclure sur l'effet de la surexpression de *Wfikkn1* uniquement si au moins deux des quatre lignées présentent un phénotype similaire. Dans le cas contraire, le phénotype observé peut être dû au point d'insertion et non à la surexpression de *Wfikkn1*. En parallèle de ces analyses *in vivo*, des expériences ex-vivo à partir de cultures primaires de muscles squelettiques de chaque lignée transgénique, sur-exprimant de façon stable le transgène, seront réalisées afin de décrypter les voies de régulations. Cette seconde partie nécessitera 20 mâles pour chaque lignée ainsi que pour la lignée contrôle soit un total de 100 mâles.

Dans un souci de respect de la règle des 3R, les animaux utilisés pour les prélèvements sanguins seront également utilisés pour les prélèvements post-mortem d'échantillons musculaires. La mise en place d'une culture primaire pour les études moléculaires permet de limiter l'utilisation du modèle *in vivo*. Cette étude permettra de mieux comprendre les voies métaboliques impliquées et d'appréhender les voies thérapeutiques envisageables. Les souris bénéficieront dans chaque cage d'un enrichissement de leur milieu (rouleau en carton, coton dentaire, morceau de bois). Les animaux seront en groupe pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement. Cela permet d'intervenir rapidement et de manière appropriée si un problème était constaté.

10820 Le tractus digestif humain héberge une flore résidente appelée microbiote qui joue un rôle fondamental dans la physiologie intestinale. Il est maintenant clairement établi que la composition du microbiote intestinal est modifiée en conditions pathologiques (cancer, maladies inflammatoires intestinales...). Ces modifications appelées dysbioses sont par ailleurs suspectées de jouer un rôle prépondérant dans le déclenchement/l'entretien de maladies (digestives ou autres). Nous savons par ailleurs que la transplantation de microbiotes provenant de souris « malades » (cancer colorectal, obèses, maladie inflammatoire intestinale...) peut transférer la pathologie à des souris receveuses.

Nous nous intéressons aux perturbations du microbiote intestinal par des facteurs environnementaux tel que l'alimentation et leur impact sur la physiologie intestinale.

Nous souhaitons explorer l'impact de microbiotes intestinaux perturbés en transférant ces derniers dans l'intestin d'animaux rendus dépourvus de microbiote intestinal. Pour cela, des souris mâles sauvages BALB/C âgées de 6 à 8 semaines recevront un traitement antibiotique de manière à éliminer le microbiote intestinal puis un transfert de microbiote à partir des fèces d'animaux donneurs sera réalisé. La durée totale de suivi des animaux (traitement antibiotique et transfert de flore) s'étalera sur une durée de 9 semaines. L'avantage de cette méthode par rapport à l'utilisation d'animaux « germ-free » appelés aussi axéniques, est de travailler sur un animal ayant un système immunitaire mature. En effet, la présence d'un microbiote (avant le traitement antibiotique) chez la souris receveuse permet la maturation du système immunitaire. Ainsi la réponse observée sera fidèle à la réalité puisqu'il est admis que l'intestin est un organe immunocompétent majeur de l'organisme. Nous utiliserons 50 souris dans le cadre de ce protocole.

Dans le cadre de la règle des 3R, un maximum de prélèvements sera effectué sur les animaux (fèces, tractus digestif, rate). De plus, les animaux seront observés tous les jours et pesés une fois par semaine durant toute la durée de l'expérience afin de nous assurer de leur bien-être. Nous

n'anticipons aucune aucun stress, perte de poids. Cependant, au moindre signe de stress/douleur, l'animal en question sera isolé et du paracétamol lui sera administré par gavage de manière à nous en assurer de sa prise (100 mg/kg). Si une perte de poids supérieure ou égale à 10% du poids total de l'animal est observée, l'animal sera euthanasié. Enfin, si un comportement anormal (vocalise, prostration...) était repéré, l'animal serait immédiatement euthanasié.

10821 Ce projet de recherche a pour principal objectif d'analyser l'expression des immunoglobulines (Ig) ou anticorps, et l'impact des chaînes d'Ig aberrantes sur le développement des lymphocytes B normaux et le développement tumoral. Les Ig aberrantes seront obtenues soit grâce à des modifications génétiques des souris soit suite à l'injection de produits à visée thérapeutique.

Les animaux seront utilisés pour différentes études :

-études immunologiques de l'animal entier : aspect histologique du tissu lymphoïde, compétence immunitaire, réponses immunes, compartiments lymphocytaires, etc...

-études cellulaires : réponse proliférative, survie/apoptose, signalisation intracellulaire, production d'Ig, etc...

-études moléculaires et génétiques : transcription et régulation post-transcriptionnelle des gènes d'Ig, répertoire antigénique, recombinaisons VDJ, analyse transcriptomique, analyse de la chromatine, etc...

Ce projet utilisera au total 834 souris.

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

Remplacer : Les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire B et le développement tumoral tel qu'il existe dans un organisme entier puisque la réponse B met en jeu des interactions entre plusieurs cellules localisées dans différents organes.

Réduire : Afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés, les études *in vivo*, cellulaires et moléculaires et génétiques sont réalisées à partir du sang et des organes prélevés sur les mêmes souris et les résultats sont analysés avec des tests statistiques adaptés.

Raffiner : Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie gazeuse lors des injections et des prélèvements de sang, surveillance par du personnel qualifié et mise à mort selon une procédure réglementaire au premier signe de souffrance, le cas échéant).

10822 Le cancer colorectal (CCR) est un grave problème de santé publique. Malgré l'existence de traitements efficaces, le taux de récurrence ou d'échappement aux thérapies atteint 10% au cours des 2 premières années qui suivent la résection de la tumeur primitive. Parmi les facteurs impliqués, les Neurotrophines et les Cellules Initiant le Cancer (CIC) semblent jouer un rôle clé dans les voies de survie responsables des échecs. Compte tenu des résultats obtenus sur culture cellulaire, il est indispensable de valider nos hypothèses sur un modèle animal de tumeur induite, respectant le micro-environnement tumoral.

Pour cela, nous souhaitons développer un modèle murin immunocompétent dans lequel un CCR sera induit chimiquement à l'aide de 2 molécules : l'azoxyméthane (AOM) et le dextran sodium salt (DSS) selon des protocoles publiés. Les souris recevront une injection intra-péritonéale d'AOM, molécule capable d'induire une lésion au niveau colique, et un traitement dans l'eau de boisson de DSS (2.5%), molécule capable d'induire et de maintenir une inflammation chronique. Au terme de 3 cycles de traitement au DSS dans l'eau de boisson (5 jours de traitement et 15 jours d'eau normale) soit 10 semaines d'expérimentation, ils seront mis à mort. Leur sang et organes (côlon, foie et poumons) seront récoltés, conservés et utilisés afin de suivre l'évolution des Neurotrophines et des CIC dans les foyers tumoraux issus des CCR ainsi induits.

Ce projet utilisera au total 50 souris.

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

Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser le microenvironnement tumoral qui joue un rôle prépondérant dans le développement et l'évolution d'une tumeur.

Réduire : le modèle de tumeur chimiquement induite est décrit dans la littérature ; le nombre d'animaux tient compte des informations publiées pour avoir des résultats exploitables.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. Si des signes de souffrance ou de détresse étaient constatés, en se basant sur l'observation de l'état général, du comportement et de la pesée, les animaux seraient sacrifiés immédiatement sans attendre les 10 semaines d'expérimentation.

10823 *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie responsable d'infection pulmonaire grave chez les patients atteints de mucoviscidose et chez les patients en réanimation. Cette bactérie, au gré de successives antibiothérapies, devient résistante à tous les antibiotiques habituellement utilisés. Aussi il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques aux antibiotiques comme les probiotiques. Les probiotiques, parmi lesquels certaines souches de *Lactobacillus*, sont des microorganismes qui, administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte.

Lors d'une précédente étude, 1 mélange de 3 souches de lactobacilles issus de patients atteints de mucoviscidose nommé *Lactobacilli psb* « Lpsb » (*L. paracasei*, *L. salivarius*, *L. brevis*) a été administré par voie intranasale de manière préventive dans un modèle murin d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*. Nous avons démontré que ce traitement préventif respiratoire à base de *Lactobacilli* diminuait de façon significative la quantité bactérienne pulmonaire à *P. aeruginosa* 24h après l'infection, par rapport au groupe de souris n'ayant pas reçu les *Lactobacillus*.

Par la suite, chacune des 3 souches a été administrée indépendamment des 2 autres par voie intranasale dans le même modèle murin. Nous avons démontré que le traitement préventif respiratoire à base de *L. salivarius* et de *L. brevis* diminuait la quantité bactérienne pulmonaire à *P. aeruginosa* 24h post-infection par rapport au groupe de souris n'ayant pas reçu de lactobacille et celles ayant reçu *L. paracasei*.

Après avoir éliminé la souche *L. paracasei* parmi les 3 souches candidates du mélange Lpsb grâce à ces expérimentations, les investigations nécessitent d'être poursuivies afin d'identifier laquelle des deux autres souches (*L. salivarius* ou *L. brevis*) possède la meilleure activité contre *P. aeruginosa*.

Lorsque nous aurons identifié la meilleure bactérie, nous souhaitons savoir si son effet est le même lorsqu'elle est désactivée par la chaleur.

Nous utiliserons 70 souris, afin de mener à bien ces deux phases d'expérimentations.

Nous analyserons la quantité de *P. aeruginosa* dans le poumon 24 heures après l'instillation du pathogène.

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

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

10824 Wfikkn2 est une protéine à domaines multiples possédant une forte affinité avec la myostatine (Gdf8), un puissant régulateur du développement musculaire dont l'inactivation entraîne une augmentation de la masse musculaire. De par ses domaines, Wfikkn2 a été identifiée comme un inhibiteur de Gdf8. Des expériences préliminaires ont montré que des souris surexprimant la protéine Wfikkn2, TgWfikkn2, présentent une augmentation de la masse musculaire mais également une augmentation de la masse grasseuse avec l'âge. Or, les souris inactivées pour le gène de la myostatine (gdf8 -/-) présentent un phénotype contradictoire. En effet, ces dernières montrent parallèlement à l'augmentation de la masse musculaire, une diminution de la masse grasseuse. Cette différence phénotypique entre les TgWfikkn2 et Gdf8-/- peut-être s'expliquer par des domaines d'expressions différents de ces deux protéines. La myostatine est exclusivement exprimée dans le muscle squelettique alors que Wfikkn2 présente un pattern d'expression plus large : le tissu musculaire, le squelette, la pancréas... Cette protéine régule-t-elle d'autres protéines ? Nous souhaitons analyser les voies de régulations du métabolisme lipidique pour identifier un nouveau rôle de Wfikkn2 : ce gène a-t-il un rôle dans la néoglucogenèse ? Est-il impliqué dans le transport des acides biliaires ? Il-y-a-t-il des organes internes présentant des modifications morphologiques et/ou fonctionnelles sachant qu'une stéatose hépatique semble présente dans cette lignée ?

Ce projet nécessite l'utilisation de trois lots de souris :

- Des souris homozygotes pour le transgène TgWfikkn2/TgWfikkn2
- Des souris hétérozygotes pour le transgène TgWfikkn2/+
- Des souris sauvages +/+

60 animaux seront nécessaires pour un suivi hebdomadaire de la croissance et de la masse corporelle du sevrage jusqu'au un an des souris, et 200 animaux pour les analyses histologiques, lipidiques et métaboliques, soit 260 animaux seront utilisés pour ce projet.

Dans un souci de respect de la règle des 3R, Il s'agit d'analyser un phénotype complexe touchant différents organes qui nous ne pouvons pas modéliser avec l'utilisation de cultures cellulaires. Les animaux utilisés pour les prélèvements sanguins seront également utilisés pour les prélèvements post-mortem d'échantillons tissulaires. Les souris bénéficieront dans chaque cage d'un enrichissement de leur milieu (rouleau en carton, coton dentaire, morceau de bois). Les animaux seront en groupe pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement. Cela permet d'intervenir rapidement et de manière appropriée si un problème était constaté.

10825 Lors du développement, les tissus sont capables de convertir des stimuli mécaniques en réponses chimiques et répondre ainsi finement à des contraintes diverses. On parle de mécano-transduction. En situation pathologique, ces processus peuvent également jouer un rôle. Ainsi, dans 80% des cancers du côlon humain d'origine génétique, les déformations mécaniques des tissus semblent jouer un rôle important dans l'initiation et la progression tumorale. Identifier les acteurs moléculaires impliqués dans ce processus ouvre une voie inédite à la compréhension des mécanismes menant au développement tumoral, et permettra, à terme, le développement de nouveaux traitements dans le cancer du côlon. A terme, la sélection de drogues antagonistes bloquant les effets observés en réponse aux pressions permettra de cibler des pistes thérapeutiques potentielles.

Nous avons ainsi récemment décrit une voie de signalisation activée mécaniquement dans le cancer du côlon de la souris. Nous avons trouvé un capteur mécanique moléculaire qui active l'expression de gènes tumoraux comme réponse à la pression de croissance tumorale. Dans ce cadre, nous avons développé une technique innovante permettant de mimer la contrainte mécanique générée par une croissance tumorale, en délivrant une pression mécanique permanente *in vivo* dans le côlon de souris, préalablement magnétisé par des particules aimantées. Nous avons ensuite démontré l'activation des cellules souches intestinales causé par cette contrainte mécanique constante. Nous voulons maintenant étudier l'effet physiologique de contraintes mécaniques péristaltiques intermittents dans l'homéostasie du côlon en comparaison avec l'effet pathologique observé de contraintes mécaniques permanentes (le péristaltisme est l'ensemble des

contractions musculaires qui assurent la progression du contenu du tube digestif, un mécanisme spontané indispensable à l'origine du transit digestif).

Le premier objectif du présent projet est de tester le rôle des contraintes mécaniques du péristaltisme endogène dans l'activation des cellules souches intestinales et le maintien de l'homéostasie de l'épithélium du côlon. Le deuxième objectif est d'étudier l'effet d'une stimulation mécanique péristaltique exogène des tissus sur la régénération de l'épithélium du côlon chez la souris, en vue d'une application clinique pour le traitement des pathologies dégénératives et inflammatoires du côlon, comme la maladie de Crohn et les recto-colites ulcéro-hémorragiques chez l'humain.

Dans le premier objectif du projet, nous allons utiliser 2 méthodes pour mimer les contraintes mécaniques péristaltiques :

1) stimulation magnétique : nous allons magnétiser le côlon avec des particules aimantées. Les souris seront ensuite soumises à un champ magnétique intermittent mimant les contraintes péristaltiques endogènes du côlon.

2) stimulation acoustique : les souris seront anesthésiées et soumises via une sonde échographique à des pulsations acoustiques intermittentes.

Dans le deuxième objectif du projet, nous allons induire des dommages tissulaires mimant chez la souris la maladie de Crohn et les colites ulcéreuses humaines (les souris seront traitées avec un agent chimique de manière permanente ou cyclée, respectivement), suivi d'un protocole de traitement par stimulation magnétique ou acoustique mimant les contraintes mécaniques péristaltiques physiologiques du côlon (conditions mises au point dans le premier objectif du projet) pour promouvoir la régénération des tissus lésés. Les souris traitées seront d'abord suivies par colonoscopie puis sacrifiées à des temps prédéterminés pour une analyse ultérieure des tissus. Dans la perspective d'une application clinique chez l'humain, nous allons chercher à optimiser les conditions de stimulation mécanique oscillant (magnétique et acoustique) pour traiter les pathologies dégénératives et inflammatoires du côlon.

Ce projet nécessitera au total 568 souris.

3R (remplacer, réduire, raffiner) :

Les questions posées dans ce projet ne peuvent être investiguées avec des modèles cellulaires *in vitro* et requièrent une complexité tissulaire qui ne peut être récapitulée qu'*in vivo*. Pour les études précliniques, la souris est le modèle plus approprié avec des techniques déjà bien établies permettant de mimer les maladies humaines. Un résultat réussi de ce projet (stimulation mécanique de l'activation de cellules souches) peut ouvrir la voie à de nombreuses applications biomédicales dans le traitement régénératif de nombreuses maladies dégénératives humaines, comme la dystrophie musculaire ou l'ostéoporose, basées sur nos outils permettant l'stimulation mécanotransductionnel *in vivo* de tissus profonds.

Le nombre de souris pourra être réduit en fonction des résultats obtenus à chaque étape, permettant de cibler les meilleures conditions d'analyse.

L'implantation de l'aimant et l'injection de particules aimantées sera réalisé sous anesthésie. Des soins avec la Bétadine® seront apportés après la pose sous cutanée de l'aimant pour contrôler la cicatrisation. Les animaux seront suivis quotidiennement et les expérimentations contrôlées de façon à minimiser et prévenir la douleur chez la souris.

Les souris traitées avec l'agent chimique seront pesées quotidiennement et dans le cas d'une déshydratation (maintien d'un pli de peau dorsal) une réhydratation en injection intrapéritonéale sera mise en place. Pour réduire la douleur éventuelle générée par l'inflammation nous allons aussi leur administrer un analgésique morphinique.

10826 Notre objectif est de démontrer que l'histotripsy (thérapie par ultrasons focalisés utilisant le phénomène de cavitation -effet mécanique-) est réalisable sur du tissu cardiaque *in vivo* en transthoracique de manière complètement non invasive. Une étude sur huit moutons à thorax ouvert avec implantation d'une bioprothèse calcifiée en position mitrale a démontré l'efficacité de

l'histotripsie en aigu sur le gradient trans-valvulaire diminuant de 50% le gradient et augmentant de plus de 50% la surface d'ouverture valvulaire. L'étape suivante sera de tester cette thérapie à thorax fermé sur un animal dont les caractéristiques de la cage thoracique sont plus comparables à celle de l'homme. Or le sternum proéminent du mouton ne permet pas de réaliser des échocardiographies transthoraciques de qualité et donc naturellement nous sommes tournés vers le porc, qui lui permet de réaliser des échographies de bonne qualité avec profondeur d'image comparable (distance cœur-thorax) à celle de l'homme.

L'enjeu serait de proposer une thérapeutique non invasive (par ultrasons) pour traiter des pathologies cardiaques normalement traitées par chirurgie ou cathétérisme. L'expérimentation sur le gros animal, de manière non invasive, est une étape indispensable pour démontrer que l'application valvulaire est possible (notamment sur le rétrécissement aortique calcifié) et pour comprendre les limites actuelles de notre technologie (pénétration des ondes à travers la cage thoracique ?, difficultés de suivi du mouvement ?, problème de puissance d'ultrason ?, temps de procédure sur une cible en mouvement ?). De plus, nous avons besoin de travailler *in vivo* sur une anatomie cardiaque similaire à l'anatomie humaine (en termes de structures et de dimensions). Le modèle porcin est donc parfaitement adapté.

Pour cette première demande 10 porcs de 35 à 40kg seront requis pour tester l'innocuité de la technique sur valve native. Les animaux seront séparés en deux groupes de 5 (groupe 1 Traité et Groupe 2 sham ou non traité) et suivront l'intégrité des procédures (anesthésie analgésie manipulation réveil) la seule différence étant que le groupe témoin ne sera pas soumis aux ondes acoustiques. L'application de l'histotripsie sur des pathologies cardiaques, et sa validation, ouvrirait des nouvelles perspectives pour la prise en charge de ces pathologies chez l'homme (cardiopathie valvulaire, cardiopathie malformative). Cela permettrait de proposer à long terme une solution thérapeutique non invasive et indolore (uniquement par ultrason), sans chirurgie ni cathétérisme. Cette nouvelle approche si elle s'avère positive transformera la prise en charge des patients avec rétrécissement aortique calcifié.

Dans le cadre de la règle des 3Rs :

Raffiner. Les porcs arriveront 7 jours avant l'intervention et seront hébergés sur caillebotis PVC en groupe sociaux durant toute la durée des procédures, le milieu sera enrichi de jouets dédiés type balles à bruit et disques à mordre. L'ensemble des procédures sera effectué sous anesthésie générale isoflurane 2.5% 30% oxygène 70% protoxyde d'azote avec analgésie morphinique. Le réveil sera effectué dans une cage prévue à cet usage avec couverture chauffante et sera suivi d'une prémédication analgésique appropriée par injection de ketoprofen (2 mg/kg durant 5 jours). La mise à mort sera obtenue par surdose de d'anesthésie (doléthol) et validée par un ECG plat.

Remplacer : L'application de l'histotripsie *in vitro* (sur tissu statique) a déjà été réalisée à de multiples reprises et validée son efficacité et son innocuité. Cependant il est indispensable de travailler sur le vivant car le mouvement cardiaque est une des principales difficultés pour l'application de cette technologie.

Réduire : de nombreux essais ont été réalisés sur organes isolés afin d'optimiser les paramètres des séquences et fréquences acoustiques utilisées en histotripsie thérapeutique. De ce fait un nombre minimum d'animaux est utilisé pour validé l'innocuité de cette technique.

10827 L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets pharmacologiques et la distribution *in vivo* de composés biologiques ou chimiques après une ou plusieurs administrations chez le rongeur, sur une période allant de 1 à 12 jours maximum.

Le mécanisme d'action de la molécule évaluée, déterminé préalablement *in vitro*, conditionnera le choix de l'espèce rongeur (souris, rat, hamster, gerbille) et de la souche à utiliser pour suivre les marqueurs d'efficacité appropriés qu'ils soient circulants, urinaires, fécaux, ou tissulaires.

Dans toute étude utilisant des animaux, il est possible de mesurer différents paramètres en utilisant diverses méthodes d'analyse (dosage de protéines ou lipides ou acides animés, expression génique, analyse histologique...). Toutefois, ces techniques d'analyse dites « froides », c'est-à-dire

sans utilisation de radioélément, ne sont pas toujours suffisamment sensibles pour quantifier les effets pharmacologiques des composés testés, notamment lorsqu'il s'agit d'études courtes.

Les deux premières procédures de ce projet permettent de révéler l'efficacité des composés testés *in vivo*, soit par administration d'une molécule froide qui activera une voie biologique précise dans l'organisme, soit par administration d'un traceur radioactif qui sera incorporé dans une voie de synthèse particulière. Ces deux méthodes permettront de sensibiliser l'organisme au mécanisme d'action ciblé par le composé testé, et de mieux appréhender la réponse pharmacologique de ce composé *in vivo*.

La troisième procédure de ce projet couvre l'utilisation d'un composé chimique ou biologique test qui a été préalablement radiomarqué afin de suivre son devenir lors d'une administration *in vivo* et de vérifier qu'il va bien atteindre les organes cibles pour délivrer son efficacité pharmacologique. Ces études pourront nécessiter l'utilisation d'animaux présentant une pathologie dommageable telle que le diabète, l'obésité, l'hypertension, la néphropathie. Un programme de soins spécifiques sera mis en place avec une surveillance rapprochée de ces animaux afin de leur éviter toute souffrance. Les effets attendus sur ces animaux restent modérés puisqu'il s'agira d'études courtes. Tout signe clinique non attendu constituera un point limite.

Pour les études d'efficacité et de recherche de biomarqueurs, une analyse statistique des données générées dans les différents modèles nous permettra de réduire au minimum le nombre d'animaux à inclure par groupe pour obtenir un effet significatif de 50% sur le paramètre d'intérêt.

Toutes les molécules chimiques ou biologiques qui seront évaluées dans ce projet auront été au préalable sélectionnées dans des tests *in vitro* (biochimiques, enzymatiques ou cellulaires) afin de s'assurer de leur efficacité et de leur absence de toxicité apparente. Elles auront aussi été sélectionnées *in vivo* chez le rongeur sur leurs propriétés pharmacocinétiques. L'ensemble de ces données est souvent insuffisant pour prédire l'efficacité *in vivo* des molécules, car recréer *in vitro* une voie métabolique complète impliquant différents tissus est difficile. L'efficacité réelle des molécules à tester devra donc être vérifiée chez le rongeur en choisissant l'espèce la plus appropriée en fonction des paramètres pharmacocinétiques et des biomarqueurs d'activité à suivre.

Pour une période de 5 ans, on peut estimer une utilisation de 1000 rongeurs/an soit au maximum 5000 animaux au total pour ce projet.

10828 L'arthrite réactionnelle fait partie de la famille des spondyloarthrites, rhumatismes inflammatoires partageant une susceptibilité génétique (antigène HLA B27) et une atteinte privilégiée des tendons et articulations. Cette maladie touche 5 personnes sur 100 000 en France. Elle apparaît dans le mois qui suit une infection urogénitale ou gastro-intestinale, le plus souvent par la bactérie *Chlamydia trachomatis*. La présence de *Chlamydia* a été détectée chez plus de 60 % des patients présentant une rhumatisme inflammatoire indéterminé. Il est fort probable que l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* soit sous-diagnostiquée.

Cette maladie est caractérisée par l'apparition de symptômes inflammatoires au niveau des grandes articulations, des yeux et du tractus urogénital. L'infection peut être traitée avec des antibiotiques mais l'arthrite réactionnelle peut réapparaître ou persister dans un état chronique dans environ 30% des cas causant alors de sévères séquelles. Plusieurs travaux ont récemment suggéré que l'infection persistante de *Chlamydia trachomatis* était à l'origine de réinfection favorisant la survenue d'arthrite réactionnelle. L'efficacité des antibiotiques sur le rhumatisme en tant que telle reste controversée et l'effet des médicaments habituellement utilisés en rhumatologie demeure mal connu. Par ailleurs, les mécanismes impliqués dans l'arthrite réactionnelle sont largement méconnus, notamment le lien entre l'infection bactérienne et l'inflammation articulaire.

Les souris SKG qui possèdent une mutation spontanée sur un gène du système immunitaire ont la caractéristique de développer, une fois infectée par du *Chlamydia* de souris, une arthrite réactionnelle. La dissémination de *Chlamydia* est assurée par les macrophages.

L'objectif de cette étude est de mieux comprendre le rôle des macrophages et des différentes cellules de l'immunité dans l'arthrite réactionnelle afin de faciliter le diagnostic, d'évaluer l'efficacité

des traitements existants mais aussi de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques dans cette maladie.

Pour cela, nous allons étudier l'infection par Chlamydia humain et Chlamydia de souris chez la souris SKG mais aussi sur un modèle de souris transgéniques surexprimant le HLA B27. L'infection persistante ainsi que l'apparition d'une arthrite réactionnelle sera recherchée cliniquement et par prélèvement de fécès et écouvillonnage vaginal au cours de l'étude, puis histologiquement après euthanasie des souris. L'efficacité de différents traitements utilisés en rhumatologie et des molécules ciblant un type cellulaire seront utilisés pour évaluer leur intérêt clinique et mieux comprendre l'implication des différents types cellulaire dans la maladie.

Ce projet s'inscrit dans la règle des 3R :

Remplacer : Le développement de cette pathologie complexe et donc son étude nécessite l'intervention d'un système immunitaire complet. Des études *in vitro* ne sont donc pas envisageables. Des mises au point seront faites en culture cellulaire.

Réduire : Le projet nécessitera 520 souris sur une période de 5 ans. 10 individus par groupe sont nécessaires pour détecter une différence statistique.

Raffiner : La durée des expérimentations est fixée à 12 semaines après l'infection pour toutes les souris. Cette durée limitée d'infection permet aux souris de développer une arthrite réactionnelle tout en limitant la douleur à un niveau faible. Au cours des études réalisées sur ce modèle, il n'a pas été constaté de souffrance particulière chez les souris infectées. Néanmoins, une surveillance quotidienne des souris sera réalisée avec calcul d'un index de score clinique. Au-delà d'un score prédéfini les souris seront retirées de l'étude et sacrifiées. .

10829 Depuis 40 ans, des biomatériaux céramiques sont utilisés en thérapeutique, et plus de 3 millions de personne en France ont déjà fait l'objet d'une implantation. Leur utilisation et leur étude trop récentes n'ont cependant pas encore permis de réaliser des matériaux suffisamment bioactifs, ostéo-intégrateurs et ostéoconducteurs, performants en médecine régénérative.

Ce projet s'intéresse au développement de biomatériaux céramiques de type hydroxyapatite phosphocalcique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) utilisables en médecine et permettant la régénération tissulaire, pour la réparation des grandes pertes de substance osseuses pour lesquels il n'existe pas de solution satisfaisante à l'heure actuelle. Ainsi, nous souhaitons à long terme permettre dans le cadre de ce projet la création d'un système d'implant osseux, qui générerait un environnement biophysique favorable pour la migration des ostéoblastes sur site, sa colonisation et sa vascularisation.

En pratique, l'objectif de ce projet est d'étudier le comportement ostéoconducteur d'implants d'hydroxyapatite phosphocalcique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) *in vivo* grâce à une technologie d'imagerie très innovante à fluorescence et multiphotonique. Ainsi, nous étudierons les modifications du micro-environnement de l'implant céramique en position crânienne, la taille et la vascularisation des échantillons sur des lignées murines.

Dans un souci de réduction, des études préliminaires par des collaborateurs locaux ont été réalisées *in vitro* en culture cellulaire 2D et 3D de façon à limiter le nombre d'animaux et à remplacer au maximum les modèles. Il s'avère cependant nécessaire d'étudier la réparation osseuse et la vascularisation à l'aide de 110 jeunes souris divisées en différents sous-groupes expérimentaux (50 non implantés, 50 implantés). La technique de microscopie envisagée permet le suivi de l'animal vivant sur plusieurs semaines, évitant son euthanasie pour l'observation et limitant ainsi le nombre d'animaux dans l'étude. Les animaux en fin d'étude seront euthanasiés et le matériel biologique servira soit à des études de biologie moléculaire *in vitro*, soit à de l'histologie.

Le projet expérimental utilise au total 110 souris et répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse d'un organisme entier face à la greffe d'implants. Ils sont aussi insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Les modèles murins d'ostéogénèse sont bien décrits et permettent de mimer le phénomène observé chez l'Homme.

Réduire : le modèle de greffe de biomatériaux est maîtrisé par l'équipe et le porteur de ce projet, ce qui permet de limiter des étapes de mises au point. De plus, des expériences *in vitro* ont déjà permis de définir certains paramètres de composition des biomatériaux. Celles *in vivo* sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée pour ces études précliniques.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, tapis chauffant pendant la chirurgie, analgésique post opératoire).

10830 Les mastocytes sont des cellules impliquées de manière centrale dans les réactions allergiques mais aussi dans la modulation de la défense immunitaire de manière plus générale. Une de leur fonction principale est la sécrétion de médiateurs inflammatoires. Comprendre les mécanismes en jeu dans leur réponse aux allergènes est donc crucial pour moduler ces mécanismes afin d'intervenir de manière efficace dans les cas d'allergie sans affecter la défense immunitaire de l'organisme. Plus particulièrement, notre objectif est de comprendre les mécanismes d'activation cellulaires suite à leur interaction avec l'allergène afin d'identifier de nouvelles cibles moléculaires pour la thérapie. Nous espérons grâce à cette étude, mieux comprendre les mécanismes présidant aux multiples réponses des mastocytes en présence d'un allergène ce qui devrait permettre de moduler certaines de ces réponses délétères (i.e l'allergie) sans perturber les réponses utiles de cette cellule importante pour la défense immunitaire." Pour ces études nous utiliserons donc des mastocytes provenant de la moelle osseuse et de la cavité péritonéale prélevé post-mortem soit des souris sauvages de la souche C57/BL6 soit manipulés génétiquement afin qu'elles expriment un médiateur fluorescent (CCL2-eGFP) à partir de cellules de moelle osseuse (mastocytes de phénotype muqueux) et de cavité péritonéale (mastocytes de phénotype séreux). Le phénotype de ces souris n'est pas dommageable. Pour évaluer le rôle des cibles identifiées nous devons :

1) mener des expériences d'activation mastocytaires par des allergènes *in vivo*. Par ailleurs des souris déficientes en mastocytes (souris *Wsh* portant une mutation naturelle) seront reconstituées en mastocytes par injection de mastocytes dérivés de moelle osseuse et des tests *in vivo* seront réalisés. 2) enfin, des souris « Nudes » seront utilisées pour produire des ascites productrices d'anticorps monoclonaux lorsque nos stocks arriveront à épuisement. A noter que des lignées cellulaires de mastocytes existent que nous avons utilisées dans un premier temps pour obtenir quelques observations préliminaires. Néanmoins, l'impact des cibles identifiées sur les fonctions biologiques des mastocytes ne peut être déterminé que si ces cellules sont replacées dans le contexte physiopathologique de l'organisme entier. Des tests d'anaphylaxie seront donc menés afin de confirmer *in vivo* les données obtenues *in vitro*. Au total nous estimons à 408 le nombre total de souris qui seront utilisées dans ces expériences pour une période de cinq ans. La première partie du projet ne rendant pas dans le champ d'une application d'une demande d'expérimentation animale il se réfère donc aux parties 1 et 2. Ce projet est conforme aux règles des 3R en limitant le nombre d'animaux au minimum requis pour la validité statistique tout en gardant les contrôles adéquates permettant d'apporter les conclusions scientifiques irréfutables (nombre de souris sur les modèles des publications). Raffiner : Pour réduire toute l'anxiété, toute souffrance et douleur associés aux procédures expérimentales nous mettons en place des traitements adéquats comme l'anesthésie et un traitement anti-douleurs. Les souris sont hébergées dans un environnement adapté et enrichi. Les signes extérieurs de souffrance chez la souris (état prostré, aux poils hérissés, yeux fermés, perte de poids) seront les critères de points limites, à partir desquels la souris sera euthanasiée. Les signes extérieurs de souffrance chez la souris (état prostré, aux poils hérissés, yeux fermés, perte de poids) seront les critères de points limites, à partir desquels la souris sera euthanasiée. Remplacer : dans la mesure du possible, des expériences *in vitro* sur des lignées cellulaires seront menées pour limiter le recours aux animaux.

10831 Le lymphome folliculaire (LF) est un cancer des cellules immunitaires de type lymphocytes B. Il se développe au sein des ganglions lymphatiques mais aussi, dans près de 70% des cas, au niveau de la moelle osseuse. Cette pathologie, malgré des avancées thérapeutiques notables, reste à l'heure actuelle incurable et sa fréquence est en constante augmentation dans les pays industrialisés. Les cellules tumorales de LF se caractérisent par l'accumulation d'altérations génétiques que les progrès récents du séquençage ont permis de préciser. Ces multiples anomalies permettent de favoriser la croissance tumorale et la résistance au traitement non seulement en agissant directement sur la survie, la prolifération, ou la différenciation des cellules tumorales mais aussi en favorisant le dialogue des cellules de LF avec les cellules qui l'entourent, aussi appelées cellules du microenvironnement ou niche tumorale. Ainsi des sous-types particuliers de cellules stromales, de macrophages et les lymphocytes T CD4 participent à la croissance tumorale. En particulier, les cellules stromales soutiennent directement la survie des cellules B tumorales et sont impliquées dans l'organisation de la niche pro-tumorale en recrutant et activant les autres cellules du microenvironnement. Cependant, l'absence de modèles *in vitro* et *in vivo* pertinents a limité, jusqu'à aujourd'hui, l'étude fine des interactions entre les cellules du microenvironnement et les lymphocytes B tumoraux dans ses dimensions spatiale, cinétique et moléculaire. Parmi les caractéristiques récurrentes des lymphocytes B du FL, une des plus fréquentes est l'expression d'un récepteur appelé BCR porteur de site de N-glycosylation dans leur partie variable (70-100% des cas). Cette glycosylation a notamment pour conséquence l'activation du BCR par la fixation d'une lectine exprimée par les macrophages (DC-SIGN) conduisant à l'activation constitutive de la voie de signalisation du BCR.

Nous utiliserons un modèle murin porteur d'une chaîne IgK humaine pré-réarrangée insérée dans le locus endogène IgK. Cette chaîne IgK particulière porte un site de glycosylation dans le CDR3. Nous croiserons ce modèle avec un modèle porteur d'un transgène Bcl2, récapitulant la dérégulation de Bcl2 sous le contrôleur des activateurs transcriptionnel du locus des chaînes lourdes d'immunoglobuline, élément déclencheur du FL humain. Sur ces modèles murins, nous analyserons le développement lymphocytaire B et la fonctionnalité de ces cellules (prolifération, apoptose, répertoire antigénique, capacité de réponse à une immunisation.) tout en surveillant l'occurrence éventuelle de lymphoproliférations. Nous analyserons également l'impact de la glycosylation du BCR sur les cellules du micro environnement des lymphocytes B, notamment les lymphocytes T.

Ce projet utilise au total 160 souris.

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

Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier et le développement tumoral qui nécessite l'interaction de plusieurs cellules dans plusieurs organes.

Réduire : le nombre d'animaux est basé sur l'expertise du laboratoire et ne peut être réduit sans limiter la portée des analyses statistiques.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, les procédures seront réalisées de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (traitement et prélèvement sous anesthésie) et les animaux seront mis à mort aux premiers signes cliniques de développement tumoral.

10832 Notre projet concerne la description des changements de l'organisation fonctionnelle des réseaux cortico-striataux dans des modèles murins de maladies neuropsychiatriques (dépression, schizophrénie, retard mental et autisme) et l'élucidation des mécanismes cellulaires de plasticité sous-jacents à cette réorganisation. La compréhension de ces mécanismes implique l'utilisation de modèles murins mutants et environnementaux. Notre stratégie expérimentale consiste en l'association d'expériences comportementales et de méthodes *ex-vivo* d'électrophysiologie / biochimie, anatomie et imagerie *in-vivo*. Une partie de nos expériences impose l'utilisation de souris

modèles du retard mental, de l'autisme et de la schizophrénie : souris *fmr1y/-*, *CYFIP-/-*, *intégrine bêta 1-/-* et *reeler +/-*. Une autre partie des expériences implique des modèles environnementaux : déséquilibre alimentaire en acides gras polyinsaturés oméga3/oméga6, exposition à un cannabimimétique durant l'adolescence ou la gestation et exposition à des lipopolysaccharides bactériens à différents stades postnataux. Globalement, les résultats de notre étude nous permettront d'identifier des réseaux neuronaux perturbés dans des modèles pathologiques, d'identifier les mécanismes cellulaires sous-jacents et de proposer de nouvelles voies et cibles thérapeutiques.

Ce projet utilisera des souris C57Bl6, et des rats Wistars car ceux-ci présentent une organisation des réseaux cortico-striataux proches de ceux décrits chez l'homme. Un total de 4334 animaux seront utilisés (2002 rats et 2332 souris).

Les modèles souris génétiquement modifiés qui modélisent de manière fidèle les pathologies neuropsychiatriques sont couramment utilisés en neuroscience rendant nos résultats pertinents pour une large communauté scientifique. Les rats sont choisis dans une procédure du fait de la richesse de leur répertoire comportemental et afin de rester en cohérence avec des résultats déjà publiés et diminuer le nombre d'animaux utilisés. L'organisation des réseaux cortico-striataux change en fonction du stade développemental, de l'activité d'autres régions sous-corticales, de l'expérience de chaque individu et de l'influence de l'environnement. De fait, les modèles rats souris ne peuvent pas être (R) remplacés par des modèles de cultures cellulaires *in vitro*.

Réduction (R) et Raffinement (R) : Ce projet est conçu pour réduire le nombre d'animaux utilisés en mutualisant au maximum les groupes contrôles et établir des mises au point communes aux différentes tâches permettant de raffiner les conditions expérimentales. De même nos expériences sont conçues pour que les mêmes animaux soient utilisés dans un maximum de tâches comportementales compatibles et en *in-vitro*. Chaque souris ou rat servent à plusieurs mesures comportementales et/ou électrophysiologiques et/ou biochimiques et/ou anatomiques. Douleur : Les animaux sont anesthésiés par Xylazine/Ketamine pour toutes les procédures chirurgicales. Ils reçoivent également des analgésiques locaux si nécessaire. Souffrance et angoisse : Les manipulations par l'expérimentateur sont limitées afin de diminuer le stress. Les animaux sont anesthésiés lorsqu'une manipulation est stressante. Le bien-être des animaux est évalué quotidiennement : prise du poids et observation de leur aspect et comportement. Tous les animaux bénéficient d'enrichissement pour diminuer l'ennui, l'anxiété et favoriser le bien être (souris : Nid végétal ; Tunnels en carton, Balles teintées. Rats : Bûchettes en peuplier ; Litière absorbante enrichie ; Tunnels en carton).

10833 Chaque année 1,5 millions d'européens sont victimes d'un traumatisme crânien le plus souvent subit lors d'un accident de la route, d'une chute ou au cours de pratiques sportives. 70 000 personnes perdent la vie des suites du traumatisme et environ 100 000 ne présentent pas de récupération totale et demeurent handicapés, notamment chez les enfants et les jeunes adultes qui représentent une population particulièrement vulnérable en regard de ce type de traumatisme. Bien qu'au cours des dernières années un raffinement des procédures de prise en charge par les urgences et les hôpitaux a permis de réduire la mortalité des traumatisés crâniens, il est apparu qu'un grand nombre de patients souffrent par la suite de désordres chroniques invalidants tels que : épilepsie, dépression, démence progressive, etc. À ce jour, aucun traitement ne permet d'empêcher la mise en place de tels désordres à la suite d'un traumatisme crânien.

Dans le but d'identifier des cibles pour de potentiels traitements, le projet que nous souhaitons développer sur 4 années vise à évaluer l'implication d'une cible particulière : les cavéolines sur la récupération après un traumatisme crânien, afin ensuite d'évaluer l'intérêt thérapeutique de la modification de leur expression.

Pour atteindre cet objectif, nous nous appuyons sur l'utilisation d'un modèle murin de traumatisme crânien (TC) peu invasif mimant la clinique humaine, nous permettant d'étudier, à l'aide de tests comportementaux et d'outils d'imagerie, les processus de neuroinflammation et de dégénérescence au niveau du système nerveux central avec une définition encore inaccessible chez l'homme. De

plus, le modèle murin nous permet d'utiliser une souche transgénique n'exprimant pas les cavéolines (Cav1-KO).

Nous allons donc dans un premier temps étudier l'impact de la déplétion en cavéolines sur la récupération post-traumatique en comparant les souris Cav1-KO aux souris sauvages (WT). Dans un deuxième temps nous étudierons l'intérêt de la supplémentation en cavéolines en injectant un peptide mimant leur effet : le Cav-AP à la fois chez les souris Cav1-KO et les souris WT afin de déterminer l'intérêt thérapeutique de la modification de l'expression des cavéolines afin d'envisager le développement de nouveaux traitements.

Le projet respecte et applique les exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement en matière d'expérimentation animale. Les procédures expérimentales décrites dans le projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Le projet concerne 544 souris. Le suivi longitudinal non invasif réalisé en imagerie permet de réduire significativement le nombre de groupes d'animaux utilisés, sans compromettre les objectifs du projet et nous permet un transfert facilité vers la clinique humaine. Finalement, le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en œuvre uniquement par du personnel technique / de recherche formé et qualifié et respecte la règle des 3R. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet et pour le garantir, les animaux sont hébergés selon les standards prévus par la réglementation : en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi (matériel de nidification, rouleau en carton et barre à ronger). Des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux. De plus, nous réalisons la procédure de traumatisme crânien sous anesthésie générale avec un protocole d'analgésie adapté et avons mis en place une surveillance accrue des animaux après induction du traumatisme afin de réagir et interrompre l'expérimentation si l'animal montre des signes de souffrance.

10834 Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) comme la maladie de Crohn sont des pathologies handicapantes et évolutives qui touchent aujourd'hui 3.7 millions de personnes en Europe. Plusieurs mécanismes biologiques jouent un rôle dans ces maladies et les traitements disponibles ne sont pas résolutifs.

Il est démontré que l'un des mécanismes physiologiques fortement impliqué dans les MICI est le système endocannabinoïde, avec ses ligands, appelés endocannabinoïdes et leurs récepteurs spécifiques nommés CB1 et CB2. En particulier, les CB1 ont été largement étudiés et représentent une cible potentielle dans le traitement des MICI.

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer si de nouveaux composés agissant comme inhibiteur spécifique du CB1 peuvent représenter une stratégie thérapeutique utile pour lutter contre les MICI. Afin de tester ça, nous allons utiliser un modèle de MICI chez la souris, avec inflammation du côlon causée par l'administration intra-rectale de TNBS (acide trinitrobenzène sulfonique).

Dans notre étude nous évaluerons la capacité de nos composés soit à prévenir soit à traiter l'inflammation du côlon induite par le TNBS. L'ensemble de ce projet nécessite ainsi l'utilisation de 1260 souris CD-1 Swiss mâles.

Au cours de notre étude, nous porterons une attention particulière à la mise en œuvre des principes éthiques fondamentaux (principe des 3Rs : Remplacement, Réduction et Raffinement) :

Remplacement : Le modèle animal de MICI a été choisi en accord avec la bibliographie scientifique. Les études *in vitro* ne peuvent cependant pas remplacer l'utilisation d'animaux, étant donné la nécessité d'évaluation des plusieurs paramètres *in vivo* et le rôle de plusieurs mécanismes biologiques dans la pathologie étudiée.

Réduction : Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre d'animaux utilisés afin d'éviter des répétitions inutiles. Des tests de puissance ont été réalisés afin de déterminer le plus petit nombre d'animaux par groupe nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement : Afin de définir les dommages et contraintes subis par les animaux, nous avons établi une grille qui permet de surveiller leur bien-être général grâce à un système de score par points.

Nous utiliserons aussi une grille d'évaluation plus spécifique à cette étude qui permet d'évaluer les altérations plus spécifiquement liées à la pathologie étudiée.

10835 Avec plusieurs millions de victimes par an, le cancer et les maladies cardiovasculaires représentent les premières causes de décès dans le monde. L'existence de facteurs de risque communs à ces deux maladies, tels que l'inflammation chronique, la dyslipidémie et l'obésité, suggère qu'elles coexistent probablement chez un grand nombre d'individus. Le but de notre étude est de déterminer si une dyslipidémie modérée et l'inflammation silencieuse qui l'accompagne peuvent favoriser le développement d'un cancer. Des données de la littérature ont montré que le système immunitaire dont l'activité est exacerbée dans plusieurs pathologies inflammatoires accélère le développement de diverses tumeurs primaires et de métastases. Notre hypothèse est que des taux élevés de lipides dans le sang modifient le comportement de certaines cellules immunitaires et favorisent le développement de tumeurs. Des données *in vitro* nous ont permis de constater que certaines cellules immunitaires mises en présence d'agents lipidiques ou inflammatoires promeuvent la multiplication de cellules tumorales via l'expression de molécules particulières. Nous devons à présent nous placer dans un contexte intégrant l'ensemble des partenaires impliqués dans ce processus, ce qui n'est possible qu'en réalisant des expériences *in vivo*. En effet, seule l'expérimentation *in vivo*, permettant de mimer la présence conjointe de ces deux pathologies et présentant le plus fidèlement possible le microenvironnement tumoral permettra de répondre à notre question.

La souris est le meilleur modèle animal permettant d'étudier conjointement le développement tumoral dans un contexte de dyslipidémie contrôlée ainsi que les réponses immunitaires mises en place. Des souris présentant ou non une susceptibilité à l'hypercholestérolémie seront soumises à un régime normal ou enrichi en matières grasses et/ou en cholestérol. Après 15 jours, nous injecterons des cellules de mélanome murin en sous-cutané afin de reproduire l'évolution d'une tumeur solide. Cette lignée tumorale provient de la même souche que les souris dyslipidémiques utilisées, et ne sera donc pas rejetée par le système immunitaire des souris. L'évolution des tumeurs sera suivie et mesurée tous les deux jours pendant 10 à 15 jours, et les souris mises à mort avant que la tumeur n'atteigne 20% du poids de la souris. Des analyses de sang seront effectuées en cours d'expérience et des analyses immunologiques poussées seront faites sur des organes (tumeur, rate, ganglions) après mise à mort des animaux. Afin de déterminer les molécules impliquées dans le processus tumoral, nous étudierons le développement du cancer chez des souris déficientes en certaines molécules du système immunitaire.

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'inclure le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats exploitables. Nous utiliserons au total 680 souris. Les paramètres expérimentaux ont déjà été établis par d'autres projets et sont publiés. Nous diminuerons au maximum la souffrance des souris grâce à l'établissement d'une grille d'évaluation de la douleur, adaptée à ce projet, qui inclura le comportement, le poids et l'apparence des animaux.

A terme, ce projet devrait permettre de comprendre plus précisément les mécanismes immunitaires reliant la tumorigenèse à d'autres maladies chroniques inflammatoires.

10836 L'objectif du projet est de cerner l'utilité thérapeutique des effets d'impulsions de champ électrique nanoseconde dans le traitement de cancers profonds et hautement résistants. En effet, ces impulsions très courtes à hautes amplitudes sont déjà connues pour affecter et éradiquer un certain nombre de cancers superficiels (par exemple, de la peau), et elles ont l'avantage d'être sans douleur, sans effets secondaires connus et de cibler précisément les tissus. Elles sont actuellement en test clinique aux Etats-Unis et en Europe dans des thérapies pour soigner le mélanome humain, et des études précliniques débutent sur le carcinome hépatocellulaire.

Notre but est de déterminer si les impulsions de champ électrique nanoseconde peuvent aussi être efficaces sur des tumeurs solides *in vivo* et très résistantes aux traitements actuels classiques (type chimiothérapies et radiothérapies), pour lesquelles le pronostic vital des patients est engagé.

Il est primordial de vérifier dans un premier temps que ces impulsions n'affectent pas les tissus sains ni les vaisseaux sanguins, ce qui implique de façon rétrograde un passage expérimental du modèle cellulaire *in vitro* au modèle animal *in vivo*.

Nous prévoyons d'utiliser une technologie d'imagerie très innovante à fluorescence et de microscopie multiphotonique *in vivo* afin de suivre l'influence de ces impulsions de champs électrique sur des tumeurs murines greffées en intracrânien chez la souris (modèle syngénique). Ainsi nous étudierons les modifications du micro-environnement tumoral, la dosimétrie, la nécrose, la mort tumorale, la taille et la vascularisation des échantillons en réponse aux traitements.

Dans un souci de réduction, nous avons déjà réalisé des études préliminaires par des techniques de culture cellulaire 2D et 3D sur membrane chorio-allantoïde mimant un environnement *in vivo* de façon à limiter le nombre d'animaux et à remplacer au maximum les modèles animaux. Il s'avère cependant nécessaire dans cette étude d'utiliser 55 jeunes souris divisées en différents sous-groupes expérimentaux selon plusieurs critères d'analyse (traitements, vascularisation, réponses moléculaires). La technique de microscopie envisagée permet le suivi de l'animal vivant, évitant son euthanasie pour l'observation de la tumeur. Les animaux en fin d'étude seront euthanasiés et le matériel biologique servira soit à des études de biologie moléculaire *in vitro*, soit à de l'histologie.

A noter que les animaux sont hébergés dans des conditions (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress des animaux en anesthésiant les animaux et en administrant des antalgiques chaque fois que nécessaire.

10837 Ce projet concerne l'évaluation d'un produit immunologique destiné à protéger contre certaines maladies respiratoires une espèce de carnivore domestique.

La mise en œuvre de ce projet comporte trois procédures expérimentales répétitives permettant d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de ce produit ainsi que la validation des outils permettant l'évaluation de l'efficacité.

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- un caractère de stricte nécessité : cette procédure ne peut pas, pour le moment, être remplacée par des méthodes alternatives
- un nombre d'animaux envisagé par groupe déterminé dans le but d'obtenir des données valides. Au total, un nombre maximum de 620 carnivores domestiques sera impliqué dans ce projet ;
- un hébergement des animaux en groupe, avec présence d'enrichissement, de manière à limiter le stress
- un recours à l'anesthésie générale, si nécessaire, pour garantir le bien-être animal
- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long des procédures ;
- des points limites adaptés et précisément définis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance des animaux.

10838 L'épilepsie est une des maladies les plus fréquentes et les plus complexes du système nerveux central. Les crises épileptiques produisent inévitablement une déficience prononcée de l'activité motrice, de la perception, de la parole et de la mémoire, car les crises entraînent, entre autres, une perte progressive des performances cérébrales.

Le système endocannabinoïde (SEC) du cerveau régule de multiples fonctions, dont l'appétit, l'activité musculaire, l'anxiété, la douleur ou encore la mémoire et s'adapte aux remodelages cérébraux liés aux pathologies telles que l'épilepsie. Un composant important du SEC est le récepteur CB1, et la grande majorité des effets causés par le cannabis est provoqué par la capacité du delta9-tétrahydrocannabinol (THC, le principal composé psychoactif du cannabis) à activer celui-ci.

Le cannabis est utilisé à des fins thérapeutiques par certains patients épileptiques malgré des résultats d'études cliniques contradictoires. Bien que des études pharmacologiques montrent les effets du cannabis, aucune tentative n'a été faite à ce jour pour expliquer expérimentalement ces contradictions. Il est possible que la dose, le type de cannabinoïde utilisé et/ou le type cellulaire ciblé puisse expliquer ces effets contraires. Il est donc nécessaire de tester de façon systématique l'intérêt thérapeutique de l'activation de certains récepteurs CB1, par certains cannabinoïdes, sur les crises épileptiques.

D'un point de vue méthodologique, ce projet respecte la règle des 3R. Ainsi, pour le R de « remplacer », le recours au modèle animal (souris dans ce cas) est indispensable car cette étude nécessite une évaluation comportementale et aucun modèle *in vitro* ne peut reproduire les conditions de la pathologie étudiée. De plus, le modèle animal souris nous permet d'étudier spécifiquement le rôle du récepteur CB1 dans certains types cellulaires et dans certaines régions cérébrales grâce aux souris mutantes conditionnelles disponibles. L'utilisation des souris est essentielle afin d'établir et d'exploiter (à long-terme) les propriétés thérapeutiques potentielles des cannabinoïdes. Pour étudier les propriétés pharmacologiques des cannabinoïdes, les souris recevront ceux-ci par injection avant traitement avec une substance qui provoque une crise épileptique afin de mesurer si ce cannabinoïde est capable de l'empêcher ou la réduire. Pour le R de « réduire », nous limitons les groupes expérimentaux à un minimum acceptable statistiquement d'où le choix de dix (10) animaux par groupe et d'une étude pilote initiale. Ce nombre prend en compte l'erreur due à l'utilisation de différentes lignées de souris et aussi au repérage stéréotaxique de la structure cible qui dépend des variabilités inter-individuelles. Pour le R de « raffiner », tous les protocoles sont optimisés afin d'éviter le stress et de soulager la douleur des animaux tout au long de cette étude. Ainsi la chirurgie stéréotaxique est réalisée sous anesthésie générale et locale avec une couverture antalgique pendant et après la chirurgie qui permettra une limitation de la douleur pendant l'anesthésie et après le réveil de l'animal. Les animaux seront surveillés quotidiennement par les zootechniciens et les expérimentateurs avec une surveillance renforcée après la chirurgie et la mise en place d'une réhydratation, un réchauffement et de traitements vétérinaires si besoin. Des points limites sont définis et décrits dans les procédures pour éviter la souffrance des animaux. La réalisation de ce projet dans son ensemble nécessite au total l'utilisation de 2560 souris sur une période de 5 ans. Ce nombre peut sembler élevé au premier abord mais il se justifie par l'utilisation de différentes approches comportementales, pharmacologiques et génétiques qui se dérouleront sur 5 ans du projet.

10839 L'endoscopie permet essentiellement une vision macroscopique des tissus. L'observation microscopique en endoscopie est limitée par la pénétration de la lumière dans les tissus. Depuis une quinzaine d'années, une nouvelle forme de microscopie dite multiphotonique permet d'observer les contrastes endogènes à l'intérieur d'un tissu jusqu'à 1 mm de profondeur. Ces contrastes sont liés à la présence de composés autofluorescents souvent mitochondriaux et aux protéines fibrillaires de la matrice extracellulaire, comme le collagène, qui peut générer un signal lumineux de seconde harmonique. La microscopie multiphotonique permet également de repérer des molécules fluorescentes exogènes (traceurs couplés à des fluorochromes). Des endomicroscopes multiphotoniques sont en cours de développement pour réaliser des biopsies dites optiques chez l'homme.

La validation des performances techniques des endoscopes multiphotoniques nécessite d'accéder à des tissus vivants à l'intérieur d'animaux vivants.

Notre projet consiste à valider les performances techniques de prototypes d'endomicroscope multiphotonique développés par des collaborateurs physiciens. Nous avons choisi de valider ces performances techniques dans 2 modèles chirurgicaux murins de fibrose rénale. Ces modèles ont été choisis car 1) le rein normal et le rein fibrosé offrent des contrastes marqués d'autofluorescence et de génération de seconde harmonique, 2) l'observation est facile à mettre en œuvre du fait de la localisation superficielle des reins, 3) les protocoles chirurgicaux sont reproductibles ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés, et 4) ces protocoles qui n'induisent de la fibrose que dans un rein sont bien supportés par les souris contrairement à des méthodes chimiques qui touchent

les 2 reins et provoquent de la souffrance et la mort en quelques jours. Dans les protocoles chirurgicaux choisis, le rein qui ne subit pas de chirurgie n'est pas altéré et reste fonctionnel ; la souris comme l'homme vit normalement avec un unique rein fonctionnel. Ce type de protocole est largement utilisé dans les laboratoires de recherche en physiopathologie rénale puisque la fibrose est une cause majeure d'insuffisance rénale.

Les performances techniques du prototype seront évaluées successivement en plusieurs étapes : étude sur des reins prélevés sur des animaux euthanasiés, puis observation unique puis répétée des reins sur des souris anesthésiées. Chaque étape sera conditionnée par la réussite de l'étape précédente. Ainsi, l'observation des reins fibrosés dans l'animal anesthésié ne sera réalisée que si les performances techniques de l'endoscope ont été préalablement validées sur des reins prélevés sur des souris mortes.

Afin de réaliser l'ensemble du projet, nous prévoyons en tout d'utiliser moins de 92 souris femelles C57BL/6 de 2 mois.

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

Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la fibrose qui met en jeu des interactions cellulaires complexes.

Réduire : le modèle est maîtrisé par l'équipe et le porteur de ce projet, ce qui permet de limiter l'utilisation d'animaux au strict minimum de 3 animaux. Les analyses réalisées ne sont pas quantifiées, mais les résultats simplement exprimés en « tout ou rien » : détection ou non d'un signal ce qui permet de valider la performance technique de l'appareil. L'utilisation de 3 animaux valide la reproductibilité de la détection.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures est réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux : chirurgie sous anesthésie profonde vérifiée, condition environnementale favorisant l'endormissement et le réveil (tapis chauffant pendant la chirurgie), utilisation d'analgésique pré réveil et si nécessaire en phase post opératoire.

10840 Les lambeaux cutanés sont utilisés en chirurgie humaine et vétérinaire pour traiter les plaies cutanées. Malheureusement, la perfusion sanguine est parfois insuffisante, conduisant le lambeau à sa nécrose et limitant le succès thérapeutique. Les données actuelles sur modèles rongeurs rapportent que l'injection sous-cutanée de cellules mésenchymateuses stromales adipeuses (ASC) améliore la survie des lambeaux, par restauration précoce de la perfusion sanguine. S'il est démontré que les ASC exercent un effet bénéfique par la sécrétion de facteurs de croissance, leur devenir dans les tissus est encore incompris. Le projet a donc pour objectif d'étudier le devenir des ASC après transplantation, dans un modèle de lambeau cutané chez le rongeur, afin d'améliorer in fine le bénéfice clinique. Au total, 505 souris seront utilisées pour le projet. A leur arrivée, les animaux seront acclimatés avant la réalisation des procédures. Leur hébergement et leur surveillance seront réalisés selon la directive 2013/118. Les souris seront hébergées en groupe. Des enrichissements supplémentaires seront introduits durant les études afin de favoriser les comportements naturels. Des maisonnettes pour rongeurs et des matières premières douces seront introduites pour favoriser la nidification, ainsi que des bûchettes. Pendant l'étude les différents actes seront pratiqués sous anesthésies générales associées à des moyens de confort (tapis chauffants, gel ophtalmique etc) ainsi qu'à des analgésiques de paliers adaptés. De plus, des points prédictifs et précoces seront définis afin de limiter la douleur à son minimum (Raffinement 3R). Les expériences sont planifiées et optimisées pour réduire le nombre d'animaux : par exemple, une validation des techniques analytiques sera réalisée à partir de cellules en culture et de prélèvements issus d'études précédentes (Réduction 3R). Le nombre de souris utilisées (24 par groupe, 6 par point cinétique) a été calculé pour donner des résultats statistiquement significatifs optimaux. Il n'y a pas d'autres alternatives que l'utilisation d'animaux vivants pour cette étude, car le devenir

morphologique et fonctionnel des ASC après transplantation ne peut être modélisé *in vitro* et informatiquement.

10841 Le trouble cognitif est un trouble mental fréquent au cours du vieillissement normal puisqu'il touche jusqu'à 50 % des sujets âgés de plus de 55 ans. Les principaux types de troubles cognitifs marqués sont le délire, la démence, la perte d'attention et l'amnésie. Les cas les plus sévères sont associés aux maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la maladie de Huntington où ils constituent un vrai problème socio-économique. A l'heure actuelle, il y a seulement quatre médicaments (donepezil, rivastigmine, galantamine et memantine) reconnus officiellement pour le traitement des symptômes cognitifs. Les effets de ces molécules restent modestes et ne sont pas dénués d'effets secondaires dont les plus courants sont des troubles gastro-intestinaux. Ainsi, la recherche vise à trouver un médicament plus efficace sans effets secondaires majeurs et à disséquer les mécanismes conduisant aux troubles cognitifs. A l'heure actuelle, le criblage des molécules aux effets procognitifs peut se faire sur les modèles basés sur la capacité d'apprentissage et de mémoire chez le rat ou la souris non transgéniques ayant un dysfonctionnement mnésique naturel lié au vieillissement ou induit artificiellement.

Dans ce projet, nous nous proposons d'utiliser un test d'évaluation de la mémoire chez la souris (T-maze) combiné avec plusieurs perturbateurs de la mémoire (scopolamine, temps, phencyclidine...) afin d'étudier les processus de mémorisation et d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques procognitives.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R,

Remplacement : aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. En effet, les processus de mémoires impliquent des interactions multiples et complexes. Bien qu'il soit possible de disséquer les événements individuels en détail avec des études *in vitro*, toutes les interactions impliquées dans la réponse comportementale *in vivo* ne sont pas possibles à simuler *in vitro*.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesures sont mises en œuvre notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement adaptées (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

Réduire : nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 10 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 28 800 souris est envisagée.

10842 La dernière possibilité de traitement pour les patients atteints de leucémies résistantes aux chimiothérapies et radiothérapies est la greffe de cellules souches hématopoïétiques. En effet, les cellules immunitaires contenues dans la greffe vont reconnaître et tuer les cellules tumorales. Cependant dans un grand nombre de cas, ces mêmes cellules vont également reconnaître et attaquer des cellules saines et provoquer ainsi la maladie du greffon contre l'hôte (Maladie du greffon contre l'hôte pour Greffon versus Host). Notre équipe a mis au point une thérapie cellulaire basée sur des cellules immunosuppressives dérivées de monocytes humains (les HuMoSC) qui permettrait d'empêcher la survenue de la Maladie du greffon contre l'hôte tout en conservant l'effet bénéfique de la greffe. Nous avons déjà démontré l'efficacité des HuMoSC *in vitro* et *in vivo* mais pour résoudre certains problèmes techniques nous avons choisi d'orienter nos études vers le surnageant (milieu de culture) des HuMoSC. Notre but est donc d'étudier les propriétés des surnageants de culture des HuMoSC CD33+ et CD14+. Nos résultats montrent que ces

surnageants de culture ont les mêmes propriétés que les HuMoSC *in vitro*. Il nous faut donc maintenant étudier ces propriétés *in vivo*.

L'objectif de ce travail de recherche est donc de confirmer l'effet inhibiteur du surnageant sur la maladie du greffon contre l'hôte.

Le système immunitaire étant un système extrêmement complexe et la complexité des réactions immunitaires au cours de la Maladie du greffon contre l'hôte ne pouvant pas être modélisée *in vitro*, nous n'avons pas de moyen de remplacement du modèle animal et devons donc effectuer nos études sur des animaux vivants.

Pour réaliser ce travail de recherche, 560 souris seront nécessaires. Elles seront réparties en groupes de 10 dans 3 axes d'études différents comportant différentes conditions expérimentales. Le nombre de souris indispensables à la réalisation de ce projet a tenu compte des exigences, de réduction en diminuant le plus possible la taille des groupes tout en permettant d'obtenir des résultats scientifiques validés.

Le bien-être des souris et la réduction de leur souffrance sera notre priorité : Le suivi de l'évolution de la maladie chez les souris sera effectué 3 fois par semaine (lundi, mercredi et vendredi) et le personnel technique de l'animalerie se chargera de l'entretien quotidien des cages dans le respect des bonnes pratiques liées à l'expérimentation animale. Les souris seront euthanasiées dès que la Maladie du greffon contre l'hôte sera sévère c'est-à-dire dès que le score de la maladie sera égal à 4 (lorsque la gravité de la maladie sera importante) Les autres souris seront gardées en vie jusqu'à la fin de l'expérience. Les symptômes pris en compte dans l'évaluation sont les symptômes typiques de la maladie du greffon contre l'hôte (perte de poids, perte de poils, dos vouté, perte de mobilité) mais aussi des symptômes de mal-être comme l'isolement, les changements de respiration etc...

10843 Notre projet vise à traiter une bactérie responsable de la plupart des maladies gastriques notamment le cancer de l'estomac : *Helicobacter pylori*. Le traitement de l'infection à *H. pylori* a connu une escalade ces dernières années passant de 2 à 3 médicaments administrés ensemble.

Bien qu'en terme d'efficacité une éradication puisse être obtenue dans 90% des cas, les effets secondaires de ces traitements sont importants, avec 30-40% de signes cliniquement détectables. Les antibiotiques administrés exercent de plus, une pression de sélection vers la résistance des bactéries exposées hors *H. pylori* et des modifications majeures du microbiote intestinal.

Il est donc de grand intérêt comme l'a déclaré l'OMS cette année de développer des recherches pour trouver de nouveaux composés antibactériens actifs sur cette bactérie.

Dans ce projet nous nous proposons de tester un nouveau composé dénommé CIN pour éradiquer *H. pylori* dans un modèle animal de souris C57 Bl/6 infectées par *H. pylori*, utilisé seul ou en association avec l'amoxicilline et/ou un inhibiteur de l'acidité gastrique.

Le principe de cette étude est donc d'infecter des souris puis de les traiter par gavage avec le ou les produits susnommés.

-Compte tenu de l'absence totale de données *in vivo*, nous envisageons au maximum 4 expériences successives chacune utilisant 60 souris, pour obtenir des données statistiquement exploitables. Autant que faire se peut nous réduirons le nombre d'animaux utilisés.

-La méthode d'infection et de traitement choisie, par gavage, est peu invasive et peu douloureuse pour l'animal.

En matière de raffinement, la souffrance ou la détresse animale sera prise en compte de la naissance jusqu'à leur mort (hébergement adapté et enrichissement dans les cages).

En ce qui concerne la réduction des animaux, nous combinerons les lots témoins.

Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux car malheureusement l'infection à *H. pylori* est trop complexe pour être entièrement modélisée *in vitro* ou *in silico* car les acteurs cellulaires et moléculaires sont extrêmement nombreux.

Ce projet va durer au maximum 5 années. Le nombre de souris requises pour la bonne réalisation des objectifs de ce projet de recherche est de 240 souris au total.

10844 La sédentarité, l'immobilisation, l'alitement et les situations pathologiques mènent à une perte de masse musculaire qui se révèle être un facteur majeur d'indépendance fonctionnelle et de qualité de vie. Ce déconditionnement musculaire est la conséquence d'un déséquilibre au sein du tissu musculaire, qui est principalement régulé par des mécanismes complexes de synthèse et de dégradation protéique. Les études menées *in vitro* sur la protéine eIF3f dans notre laboratoire mettent en évidence son rôle pivot dans la balance entre synthèse et dégradation protéique au sein du tissu musculaire. Pour confirmer ces résultats *in vivo*, deux modèles murins génétiquement modifiés ont été développés au laboratoire. Ces modèles animaux permettent dans différentes situations de mettre en lien la quantité d'eIF3f produite avec la réponse physiologique observée afin de mieux cerner les rôles de cette protéine. Nous proposons ainsi i) d'étudier les conséquences fonctionnelles du niveau de production d'eIF3f sur nos modèles animaux (endurance, vitesse, force, composition corporelle), ii) d'établir les rôles d'eIF3f dans l'équilibre entre synthèse et dégradation protéique lors de l'immobilisation de la patte et de sa remobilisation et iii) de déterminer l'impact du niveau de production d'eIF3f sur les capacités de régénération du tissu musculaire. Ainsi, l'étude plus approfondie des rôles de cette protéine présente un intérêt essentiel dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques de maintien de la masse musculaire.

Pour ce projet, nous proposons d'utiliser 360 souris sauvages et 576 souris génétiquement modifiées (Total : 936) dans 8 procédures.

Les animaux seront hébergés collectivement en cages ouvertes transparentes avec pour enrichissement des carrés de ouate. Pour les deux procédures nécessitant d'individualiser les animaux ceux-ci recevront un enrichissement adapté et garderont le contact visuel avec leurs congénères. Nous effectuerons une visite de surveillance par jour, y compris les week-ends pour vérifier l'état de santé des animaux ainsi que les conditions environnementales.

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

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux, à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et pour palier l'abandon de certaines souris dans l'expérimentation. Pour réduire le nombre de souris sauvages nécessaire, nous utiliserons celles issues des portées des élevages eIF3f. Pour les procédures ne nécessitant pas de mise à mort, les mêmes animaux après une période de récupération seront utilisés. Lorsque cela est possible l'animal sera son propre contrôle, afin d'éviter l'utilisation d'animaux supplémentaires.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites :

Comme développé pour chacun de nos protocoles expérimentaux, nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos animaux. Les suivis quotidiens des animaux permettent d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris : cris, mobilité, alimentation... Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou une perte de poids excessive ($\geq 15\%$ du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié si les signes persistent dans les 24h.

- « Remplacer » les modèles animaux :

L'étude des rôles de la protéine eIF3f s'inscrit dans l'objectif d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le maintien de la masse musculaire. Les résultats obtenus sur cellule musculaire mettent en évidence un rôle fondamental de cette protéine dans la balance entre synthèse et dégradation protéique au sein du tissu musculaire. Ainsi, la compréhension des mécanismes liés à eIF3f et impliqués dans l'équilibre de la masse musculaire *in vivo* est nécessaire. Dans ce cadre, l'expérimentation animale constitue la continuité du projet débuté sur modèle cellulaire. Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier influencent la cinétique de perte ou de gain de la masse musculaire. De fait, nous nous sommes orientés vers le modèle animal se rapprochant le plus de l'humain sur la physiologie musculaire et avons donc choisi la souris. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

10845 Le virus Lassa (LASV) a un impact significatif sur la santé et l'économie des pays d'Afrique de l'Ouest, infectant environ 500000 personnes chaque année. LASV est responsable d'environ 6000 morts par an, avec des taux de fatalité atteignant près de 50% chez les jeunes enfants. De plus, 20% des survivants présentent des complications long-terme, notamment un déficit auditif. Bien qu'étant un problème de santé publique majeur dans les pays endémiques, il n'existe à ce jour aucun vaccin pour prévenir les infections à LASV et aucun traitement complètement efficace. Le développement de vaccin LASV a notamment été ralenti par le manque de connaissance sur ce pathogène de classe 4. Le projet de recherche se concentre sur une meilleure compréhension des infections à arénavirus et sur le développement de contre-mesures. En ce sens, nous avons rationnellement développé des vecteurs recombinants basés sur une souche vaccinale du virus de la rougeole (MeV) exprimant des antigènes de LASV.

Leur innocuité, leur immunogénicité et leur efficacité ont précédemment été démontrées chez le singe cynomolgus permettant de sélectionner le meilleur candidat, MeV/LASV, pour son développement vers des phases cliniques. Le but de ce projet est de démontrer que MeV/LASV peut protéger le singe cynomolgus contre des souches divergentes du virus LASV. En effet, il existe une grande diversité génétique parmi les virus Lassa qui circulent, avec 6 groupes distincts (clade 1 à 6) décrits. Notre vaccin exprime des antigènes d'un virus appartenant au clade 4. Il n'est pas nécessaire de démontrer la protection croisée contre tous les clades. Une protection acquise contre les virus les plus divergents permettra de conclure à l'efficacité du vaccin contre l'ensemble des souches de virus Lassa. Nous avons donc décidé de tester deux clades différents, le 2 et le 6, qui représentent les souches les plus divergentes par rapport au clade 4 présent dans le vaccin. Afin de valider cela contre des souches récentes et circulantes, nous utiliserons deux virus récemment isolés lors d'épidémies survenues au Nigéria (clade 2) et au Bénin (clade 6).

Dans ce but, nous proposons un projet de recherche fondamentale d'une durée de 5 ans. Un total de 12 singes cynomolgus sera utilisé, répartis en 4 groupes. Afin d'obtenir des résultats statistiques significatifs et robustes (Logrank test) tout en respectant la règle des 3R (remplacement, raffinement et réduction), les animaux seront répartis en 4 groupes. Le groupe 1 sera composé de 4 singes vaccinés par MeV/LASV et infectés par LASV-Bénin ; le groupe 2 de 4 singes vaccinés par MeV/LASV et infectés par LASV-Nigéria ; le groupe 3 de 2 singes contrôles vaccinés par MeV et infectés par LASV-Bénin ; le groupe 4 de 2 singes contrôles vaccinés par MeV infectées par LASV-Nigéria. Les singes seront équipés du système de puce permettant d'avoir leur suivi de température toutes les quinze minutes. Ces mesures seront très utiles pour valider l'efficacité du vaccin (et son innocuité après l'immunisation), puisque la fièvre est le signe clinique le plus évident à objectiver chez le singe infecté par le virus Lassa. Le suivi clinique sera réalisé quotidiennement par le personnel formé et expérimenté. Les animaux ne seront pas manipulés vigiles, uniquement sous anesthésie lors desquelles les prises de poids, de température et les prélèvements de sang seront réalisés (une attention particulière sera portée lors des prélèvements de sang afin d'éviter la formation d'hématome grâce à de longs points de compression et la pose d'une pommade anti-oedémateuse locale). Un vétérinaire sera d'astreinte pendant la durée de l'expérimentation et interviendra si nécessaire. Une attention sera également portée sur l'enrichissement alimentaire, de confort et de stimulation. Les résultats obtenus précédemment sur ce modèle nous permettent d'anticiper la dégradation de l'état de santé des animaux et de prendre les mesures nécessaires pour réduire l'état de souffrance des animaux dès que le point limite est atteint. L'infection après vaccination par le MeV/LASV ne devrait pas avoir d'effet néfaste chez les animaux. Seuls les contrôles présenteront des effets néfastes sévères, notamment des changements de température corporelle, une perte de poids, une baisse de l'alimentation et de l'hydratation ainsi qu'une baisse de tonus. Les animaux atteignant le point limite au niveau du score clinique ou atteignant le terme de l'expérimentation seront anesthésiés puis euthanasiés afin de procéder à une nécropsie avec collecte d'échantillons.

10846 Le cancer du foie est une maladie en pleine expansion avec actuellement plus de 8500 nouveaux cas par an en France et plus de 7000 morts par an. Il survient sur fond de maladie chronique du foie dans plus de 95% des cas. Le rôle du système immunitaire apparait de plus en plus comme un

élément central dans la progression de la maladie et spécialement par le biais des macrophages résidant dans le foie. Ces cellules apparaissent donc comme une nouvelle cible thérapeutique dans le champ des cancers solides. Dans ce projet, nous proposons de comprendre l'implication des macrophages dans le processus tumoral dans l'optique de cibler ces cellules dans le CHC.

La fibrose et/ou la cirrhose modifient la vascularisation hépatique, la composition de la matrice extracellulaire et le métabolisme des médicaments. Par conséquent, il est essentiel d'utiliser un modèle animal avec CHC (Carcinome Hépato-Cellulaire) dans le contexte de Fibrose/Cirrhose qui nous permettra ensuite d'étudier dans un contexte tissulaire adéquate l'interaction entre les macrophages et les cellules cancéreuses. La souris n'est pas capable de développer une cirrhose décompensée. Ce n'est donc pas un modèle animal qui reproduit la pathologie humaine. Depuis plusieurs années un modèle animal de rat permettant de mimer au mieux la pathologie humaine de développement tumoral hépatique sur fond cirrhotique a été développé (rats DEN=Diethylnitrosamine). Dans le présent travail, nous nous proposons de profiter de ce modèle pour comprendre comment les macrophages associés à la tumeur interagissent avec celle-ci et comment nous pouvons cibler ces cellules pour contrecarrer la progression de la maladie. L'approche méthodologique reposera sur une déplétion des macrophages résidents dans le foie. Nous étudierons si le fait de retirer les macrophages à différents stades de la maladie impacte le déroulement de celle-ci, avant ou pendant l'apparition des lésions tumorales.

Ce projet a été élaboré en appliquant la démarche éthique. L'application du principe des 3R est argumentée ci-dessous.

La carcinogenèse hépatique est un processus impliquant différents types cellulaires au sein du foie. Les lignées hépatocytaires tumorales humaines ne permettent pas de reproduire tout ce processus et notamment lorsque l'interaction entre cellules cancéreuses et cellules immunitaires est envisagée. L'utilisation de modèles animaux est donc indispensable dans ce type d'études et ne peut être remplacée.

Le stress et la douleur des animaux sera minimisée par l'utilisation d'anesthésie lors des gestes invasifs et imagerie par IRM. Le raffinement des 3R s'étend aussi au-delà de ce projet avec un impact fort sur la méthodologie à venir et la transposition des résultats à l'homme.

En utilisant un modèle de CHC déjà existant nous pourrions adresser la question du rôle des macrophages à plusieurs étapes du développement d'un cancer et ainsi choisir l'étape ad hoc pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans les phases précliniques. De plus, un calcul des effectifs nécessaires basé sur une variable biologique simple (incidence de CHC dans le modèle DEN) nous permettra d'atteindre une significativité des résultats avec un minimum d'animaux.

Un total de 140 rats sera nécessaire pour cette étude.

10847 L'obésité affecte environ 10% de la population mondiale et cause le syndrome métabolique. Les adipocytes sont caractérisés par une capacité unique d'expansion du volume cellulaire provoqué par l'accumulation de triglycérides avec une augmentation marquée de la rigidité cellulaire. Par conséquent, au sein des dépôts adipeux, les adipocytes hypertrophiés sont soumis à une contrainte mécanique qui est transmise aux cellules résidentes. Nous postulons qu'une boucle de rétro-action mécanique positive agit dans le processus d'adipogenèse. Selon cette hypothèse, l'activation de voies mécano-sensibles spécifiques influence la différenciation des cellules précurseurs en adipocytes matures, avec une accumulation accrue de lipides. De plus, le stress mécanique des adipocytes hypertrophiés influence également la synthèse / sécrétion des adipokines, provoquant l'inflammation adipeuse. Ainsi, le stress mécanique au sein des tissus adipeux affecte significativement la structure et la fonction physiologique du tissu adipeux, représentant un facteur nouveau et important à considérer dans le contexte de l'obésité. Nos résultats préliminaires indiquent que le canal ionique mécano-sensible Piezo1 est fortement exprimé dans le tissu adipeux, y compris les précurseurs et adipocytes matures. Nous allons étudier le rôle de Piezo1 dans la régulation de la croissance, de la synthèse / sécrétion des adipokines, ainsi que de l'inflammation adipeuse. Ces résultats fourniront de nouvelles informations sur la mécano-biologie du tissu adipeux et plus particulièrement permettront de définir le rôle de Piezo1 comme cible thérapeutique

potentielle pour le traitement de l'obésité et du syndrome métabolique associé. Pour mener à bien ce projet, il sera nécessaire de recourir à 120 souris. Nous avons conçu notre plan expérimental dans le souci de la règle des 3R : -Remplacement : nous avons d'ores et déjà élucidé les mécanismes *in vitro* qui sous-tendent notre hypothèse. Nous avons besoin de les valider dans un organisme entier tel que la souris car pour le moment, aucun système *in vitro* ne nous permet de reproduire l'ensemble des mécanismes physiologiques d'un organisme entier. L'utilisation du modèle primate est très compliquée tant d'un point de vue éthique, financier et pratique. De par ses similarités avec la physiologie humaine et parce que le modèle d'inactivation de Piezo1 chez la souris est déjà établi, la souris constitue le meilleur modèle pour adresser nos questions dans une perspective préclinique. - Réduire : nous avons effectué une large recherche bibliographique afin de nous assurer de ne pas dupliquer des protocoles expérimentaux déjà réalisés. Cette recherche bibliographique nous a permis d'optimiser nos procédures et le nombre d'animaux à utiliser afin d'obtenir des résultats statistiques exploitables, robustes et valables. - Raffinement : Le raffinement de notre projet s'effectue à partir de la naissance des souris et tout au long des procédures. Cela débute par la reproduction et le maintien des animaux dans une animalerie conventionnelle et agréée avec le personnel formé et habilité et le respect de la taille d'hébergement en fonction du nombre d'animaux. Des dispositifs d'enrichissement de milieu (un igloo et carrés de ouate compressée) sont présents dans toutes les cages. Durant la phase expérimentale, le personnel technique habilité et formé, veillera à l'application de procédures visant à minimiser toute souffrance ou stress (notamment anesthésie/analgésie), réalisera les tests et notera toutes remarques pertinentes durant ou après la réalisation des tests expérimentaux sur des fiches de suivis. Ces fiches incluent des grilles de scores avec des points limites précis, clairs et adaptés à nos expérimentations. La mort n'étant pas un point limite acceptable, nous sortirons les souris de l'étude lorsqu'un des points limites sera atteint et en cas de nécessité nous pratiquerons une euthanasie d'urgence.

10848 A l'heure actuelle, on pense que les pathologies neurodéveloppementales telles que l'autisme ou l'épilepsie sont dues en partie à des facteurs génétiques mais il reste encore à les caractériser et à préciser leurs rôles. Dans ce domaine l'utilisation de lignée de souris transgénique c'est-à-dire possédant la même mutation sur un gène impliqué dans les troubles du développement cérébral chez l'homme est un outil indispensable pour faire avancer la recherche.

Au sein de notre laboratoire, nous travaillons sur un gène de susceptibilité lié à l'épilepsie dont des mutations sont à l'origine d'une maladie rare (1/1.000.000) appelée « épilepsie myoclonique progressive de type 5, EPM5 », sans que l'on connaisse les bases moléculaires et cellulaires de cette pathologie.

Si l'EPM5 est une maladie très rare, l'épilepsie est le résultat d'une activation survenant subitement, de manière simultanée et anormalement soutenue, d'un nombre très important de neurones du cerveau. Elle peut être associée à des myoclonies qui sont des secousses musculaires isolées survenant brièvement des deux côtés du corps de manière symétrique. En France, 0,6 à 0,7 % de la population est concernée et dans 75 % des cas, la maladie s'est installée avant 18 ans (OMS). Il est donc essentiel d'identifier et de classer les origines moléculaires des différentes formes d'épilepsie, ainsi que leur évolution lors du développement.

Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés aux troubles du développement du cerveau caractéristique de ces pathologies, l'étude chez l'animal est indispensable. Ce projet vise à caractériser une lignée transgénique présentant une délétion de ce gène d'intérêt, créée récemment, afin d'identifier la nature exacte des éventuels troubles de développement cérébral liés à l'épilepsie.

Notre projet visera à élucider les bases moléculaires de l'EPM5, à la fois lors du développement du système nerveux central mais nous évalueront également le rôle du gène d'intérêt dans la fonction adulte du cerveau. Notre projet repose sur une approche intégrative nécessitant le fonctionnement du cerveau dans son intégrité ce qui reste encore impossible à modéliser. Il est probable que l'étude de cette protéine neuronale permettra d'aborder de nouveaux mécanismes physiopathologiques, qui pourront sans doute être transposables aux formes communes d'épilepsie. Cette étude pourra aussi nous guider vers le développement de nouvelles cibles pharmacologiques.

Règle des 3R.

Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. Pour autant, le seul modèle animal de l'épilepsie, suffisamment caractérisé à ce jour, reste le modèle murin transgénique. Par conséquent, nous pensons qu'il n'existe pas de remplacement disponible à notre modèle expérimental qui permettrait d'atteindre les objectifs scientifiques du travail proposé.

Raffiner : Certains effets défavorables peuvent résulter de l'ablation d'un gène et le but du raffinement est de minimiser les effets négatifs sur le bien-être animal (voire le décès) associés aux animaux transgéniques créés. L'impact de cette altération peut entraîner des anomalies sévères lors du développement embryonnaire, pouvant conduire à des décès prénataux ou postnataux. Dans notre cas particulier, il n'est pas exclu que l'ablation (même partielle) du gène d'intérêt n'entraîne pas des crises d'épilepsie spontanées. Aussi, seront mis en place tout au long de la création de cette lignée : un suivi systématique des critères d'interruption (points d'arrêt anticipés) et, le cas échéant, un protocole d'atténuation de la souffrance par l'administration d'anesthésique. Pour supprimer l'angoisse ou la détresse des animaux au cours de la procédure, les animaux sont élevés en cage collective enrichie et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place.

Réduire : Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, un minimum de 3 et 6 trios de souris (1 mâle et 2 femelles par cage) seront utilisés pour produire la génération de souris désirée. Ensuite, pour maintenir la lignée, 2 trios seront hébergés en continu et cela sur 5 ans. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à la création de la lignée est de 129 souris plus 120 souris pour maintenir la lignée sur 5 ans

10849 La néphropathie IgA est une des maladies rénales les plus répandues dans le monde et représente une cause majeure d'insuffisance rénale qui est associée à des infections microbiennes au niveau des sites muqueux (intestin et poumon). Il a été montré que chez des patients souffrant de cette maladie, il existe une augmentation du taux de certaines bactéries dans l'intestin. En revanche, les molécules responsables de cette augmentation au cours de cette maladie restent à identifier. Nous possédons une souris modifiée génétiquement qui développe spontanément cette maladie. Pour identifier ces molécules ainsi que le mécanisme par lequel l'augmentation de ces bactéries aggrave la maladie nous analyserons l'effet de ces bactéries dans le développement de la maladie en utilisant notre souris prétraitée avec des antibiotiques (pour éliminer toutes les bactéries intestinale). Ce projet nécessitera un nombre total de 605 animaux au total. Les phénotypes des souris utilisées dans ce projet sont non dommageables.

Ce projet se déroulera sur une période de 5 ans.

La conformité avec les exigences de réduction, raffinement et remplacement seront pris en compte : 1) Remplacement ; les connaissances issues de cette étude *in vivo* ne peuvent pas être obtenues actuellement par d'autres méthodes compte-tenu de la complexité physiologique de la réponse inflammatoire et de la fonction rénale qui nécessite de travailler à l'échelle d'un organisme. 2) Réduction ; dans ces différents modèles le taux de mortalité est faible (environ 2%), nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant dans chaque sous-groupe pour avoir des résultats statistiquement exploitables à 5 par sous- groupe. 3) Raffinement, les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Une anesthésie sera effectuée lors des procédures douloureuses pour l'animal et l'utilisation d'antalgiques sera systématique si l'animal présente des signes de douleur au cours de l'expérimentation. Les signes extérieurs de souffrance (perte de poids au-delà de 20-25 % par rapport au groupe contrôle, prostration, poil hérissé, saignements) seront les critères de point limites à partir desquels nous procéderons à l'euthanasie de l'animal.

L'objectif de ce projet permettra d'aboutir à une application thérapeutique qui est soit préventive soit active sur la progression de la maladie.

10850 Les neuropathies périphériques induites par les anticancéreux (toxicité neurologique des anticancéreux) sont un véritable problème en oncologie. En effet, les cancers sont des pathologies de plus en plus fréquentes dans les pays occidentaux, et en fonction de l'anticancéreux et des doses cumulées, ces neuropathies peuvent affecter jusqu'à 90% des patients, comme avec l'oxaliplatine (anticancéreux de référence dans le cancer colorectal). Ces neuropathies sont associées à des paresthésies (fourmillement), des dysesthésies (hypersensibilités tactiles ou thermiques douloureuses) et à des douleurs spontanées affectant principalement les extrémités des membres (distribution en gants et chaussettes). Or à ce jour, aucun traitement n'a démontré une efficacité univoque et les oncologues sont alors contraints de diminuer les posologies d'anticancéreux voire d'arrêter les traitements anticancéreux, au risque d'induire des neuropathies responsables de fortes comorbidités (dépression, troubles du sommeil, baisse de la qualité de vie) chez des patients déjà atteints d'un cancer ou en rémission d'un cancer.

Des travaux ont démontré l'implication du système cholinergique au niveau du cerveau (cortex insulaire) et de la moelle épinière d'animaux présentant une neuropathie induite par l'oxaliplatine (anticancéreux utilisé dans le cancer colorectal). De la même manière, le donépézil, un agent procholinergique, a démontré son efficacité sur les douleurs neuropathiques sur ces mêmes modèles animaux.

Comme le donépézil possède déjà une autorisation en médecine humaine dans la maladie d'Alzheimer, il serait possible de l'utiliser rapidement chez l'homme pour traiter les neuropathies induites par les anticancéreux. Cependant, avant le passage à l'homme, il est nécessaire de continuer à valider l'efficacité du donépézil dans d'autres modèles animaux de neuropathie induite comme le paclitaxel (anticancéreux utilisé dans le cancer de l'ovaire, du sein et du poumon).

L'objectif de ces travaux consistera à explorer l'efficacité du donépézil sur un modèle animal de neuropathie induite par le paclitaxel (non testé jusqu'alors).

Pour ce projet, 432 rats mâles Sprague-Dawley (âge : 6 semaines) seront nécessaires.

Pour l'ensemble des expérimentations envisagées, la règle des 3R sera appliquée afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, d'avoir recours à des tests validés dans la littérature scientifique et de limiter la souffrance animale.

Le nombre d'animaux utilisés sera limité au maximum. Les inclusions d'animaux seront interrompues si les résultats sont significatifs avant l'inclusion de tous les animaux prévus dans l'étude.

Les animaux seront suivis régulièrement, à minima tous les 2 jours (week end compris) et le lendemain des injections, afin de détecter tout comportement douloureux anormal.

Comme l'objectif de l'étude est l'évaluation des troubles neuropathiques, il ne sera pas envisageable de prendre en charge les douleurs par un traitement antalgique conventionnel. Si un animal manifeste des troubles comportementaux en lien avec une douleur (prostration, pelage souillé, hérissément du poil), il sera alors euthanasié par inhalation de CO₂.

A noter cependant que les modèles sont suffisamment évolués (raffinement du choix des doses), de telle sorte que ce genre de comportement ne se rencontre que très rarement. Aussi, les tests comportementaux réalisés permettant d'évaluer les troubles neuropathiques chez les animaux nécessitent d'avoir des animaux dans un bon état général.

L'administration d'analgésiques ne sera pas possible lors des tests comportementaux car ceci explore la douleur. Mais ce sont des tests d'évitement permettant d'interrompre le stimulus immédiatement par l'animal.

L'administration d'analgésiques pour les injections intrapéritonéales et les administrations orales ne sont pas nécessaires, les procédures sont très rapides et seraient elles-mêmes pourvoyeuses d'un stress supplémentaire pour les animaux.

La procédure d'injection intrathécale (injection le long de la moelle épinière) impose une anesthésie générale de courte durée à l'isoflurane à 2% pour prévenir toute douleur de l'animal.

Le recours à l'animal demeure indispensable pour reproduire la complexité des symptômes présenté par les patients en cliniques.

10851 Plusieurs études montrent que les polyphénols issus d'extraits de plantes ont des effets bénéfiques sur diverses fonctions physiologiques chez différentes espèces. Ainsi, il a été montré récemment que les œufs des oiseaux sauvages présentent des teneurs en antioxydants (vitamine E, caroténoïdes de 5 à 10 fois) supérieures à celles des oiseaux domestiques, ce qui pourrait avoir des conséquences sur la croissance de la descendance. Notre projet a pour but de déterminer l'influence des extraits de pépins de raisin riches en polyphénols sur la génération suivante. Notamment sur la croissance, l'engraissement, la croissance osseuse, ainsi que sur la concentration de biomarqueurs du métabolisme et sur les performances de ponte et la qualité du sperme.

Notre objectif est de déterminer si une alimentation plus riche en polyphénols peut avoir des effets bénéfiques sur la génération suivante. Pour cela nous souhaitons mener une étude sur le développement des organes, tissus et os, à l'aide des outils d'imagerie scanner et échographie. Pour cela nous utiliserons 2 groupes de 20 mâles (groupe contrôle, groupe exposé par des polyphénols) et 2 groupes de 20 femelles séparées. Les animaux seront suivis de l'éclosion à l'âge adulte (35 semaines). Les 4 groupes de poussins recevront la même nourriture après l'éclosion et seront nourris dans les conditions d'élevage classique. Les poules et poulets seront analysés au CT-scanner et échographie, des pesées régulières (tous les mois) et des dosages sanguins seront réalisés le jour de l'analyse par imagerie afin de relier les données d'imagerie à des données métaboliques. Les animaux seront endormis pour les analyses d'imagerie.

A 25 et 30 semaines d'âge, l'ensemble des poules (n=40) sera inséminé artificiellement avec du sperme issu de coq (groupe contrôle). Les œufs seront collectés pendant 3 semaines consécutives avec mise en incubation régulière après 7 jours de collecte. La fertilité, la mortalité embryonnaire (précoce et tardive) et le taux d'éclosion seront enregistrés au couvoir. Après éclosion, les poussins (un total d'environ 300 poussins pour les 2 lots) seront élevés collectivement jusqu'à 10 jours d'âge afin d'évaluer l'impact du traitement alimentaire des mères sur les performances des poussins (mortalité, croissance et consommation d'aliment). L'effectif total des animaux utilisés dans le protocole est donc de 40 poules, 40 poulets et 300 poussins issus de la génération suivante.

La règle des 3R a été respectée comme suit : Remplacer : Pour évaluer les réponses physiologiques telles que l'évolution du poids, l'engraissement, la performance de ponte et la fertilité, il faut disposer des mesures sur les animaux et le modèle le plus adapté est la poule et le poussin dans notre protocole. Réduire : Une analyse a été réalisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. Raffiner : Les poules et les coqs seront séparés et élevés au sol dans des conditions comparables à celles d'élevages classiques. Les animaux peuvent se voir. Les enrichissements mis en place sont essentiellement des blocs à piquer et des objets suspendus. Toute intervention sur les animaux sera réalisée par un personnel compétent. Les animaux seront surveillés tous les jours y compris les week-ends. Le comportement, la prise alimentaire, et la croissance des animaux sont des indicateurs de leur état de santé.

10852 Notre étude est centrée sur l'ostéosarcome, la plus fréquente des tumeurs osseuses malignes primitives qui affectent dans la majorité des cas une population jeune (10-20 ans). En dépit des progrès de la poly-chimiothérapie associée à la chirurgie, il reste encore trop de jeunes patients dans des situations d'impasse thérapeutique.

Les bisphosphonates (BPs) font partie de l'arsenal thérapeutique de ces cancers osseux. Cependant, malgré leurs effets bénéfiques, les thérapies à base de BPs, qui nécessitent des doses élevées pour être efficaces, entraînent des effets secondaires considérables. Au fil de la maladie, ces effets secondaires deviennent de plus en plus lourds à accepter par le patient et conduisent trop souvent à une décision d'arrêt du traitement par le clinicien.

Aussi un apport de BPs directement au contact de la tumeur en site osseux apparaît comme une stratégie pertinente permettant de diminuer les doses à administrer et par là même limiter les effets secondaires tout en conservant le potentiel curatif des BPs. Dans le cadre d'une collaboration avec un partenaire industriel nous disposons de ciments sur lesquels ont été greffés des BPs.

Dans le programme thérapeutique des ostéosarcomes, lorsque l'état du patient le permet, la tumeur osseuse est chirurgicalement enlevée, et la perte de substance osseuse (défaut osseux) qui en résulte est comblée dans la plupart des cas par des biomatériaux notamment des ciments. Néanmoins, il n'est pas rare que le chirurgien ne puisse pas totalement éliminer la masse tumorale ce qui va entraîner inévitablement des rechutes locales ou à distance (métastases). Comblé le défaut osseux à l'aide de ciments aux propriétés anti-tumorales permettrait d'éradiquer les cellules cancéreuses tumorales résiduelles et de limiter ainsi les risques de récurrence loco-régionale et de métastases.

Notre projet qui nécessitera 145 rats a pour objectif de tester dans un modèle d'ostéosarcome de rat, le potentiel anti-tumoral de ces ciments pour à terme et le plus rapidement possible, le proposer en clinique chez l'homme.

D'un point de vue expérimental, notre étude met en jeu un modèle d'ostéosarcome de rat, radio-induit et transplantable chez le rat immunocompétent, qui est reconnu pour avoir un développement similaire à la maladie humaine. En terme de remplacement, il est indispensable de réaliser un essai préclinique de ces ciments, car il n'existe pas actuellement de méthodes alternatives permettant d'intégrer l'ensemble des cellules du microenvironnement tumoral. En terme de réduction, le nombre de rats a été calculé pour limiter l'utilisation des animaux tout en assurant des résultats statistiquement fiables. En terme de raffinement, tous les animaux seront manipulés le plus paisiblement possible et hébergés par 2 dans des cages enrichies (cubes de bois, tiges et carrés de coton). Les animaux recevront un traitement contre la douleur pendant toute la durée de l'expérimentation. Les animaux seront visités régulièrement afin 1- de détecter tous signes d'inconfort/souffrance et 2-mettre en place des solutions adaptées aux problèmes identifiés.

10853 La maladie d'Alzheimer (MA) évolue de façon continue, depuis une forme préclinique sans symptôme apparent jusqu'à une maladie caractérisée au moyen de tests de mémoire et de différents tests biologiques. Le développement de nouveaux traitements exige des méthodes diagnostiques permettant la détection précoce et le suivi des lésions cérébrales dans la population à risque. La MA se caractérise, du point de vue physiopathologique, par la présence dans le tissu cérébral de deux types de lésions. On observe, d'une part, des plaques extracellulaires formées de polymères de peptide amyloïde dans le cortex cérébral ; d'autre part, des lésions intracellulaires dites dégénérescences neurofibrillaires (DNFs) composées d'agrégats de la protéine tau, particulièrement dans la région cérébrale impliquée dans la mémoire. La forme intracellulaire précoce de ces lésions est constituée par des petits polymères (oligomères) toxiques de la protéine tau. La mise au point de nouvelles molécules radioactives, permettant la détection des formes pathologiques précoces de Tau en imagerie nucléaire, constitue un défi majeur tant pour le diagnostic de la MA, la sélection des patients inclus dans les essais thérapeutiques cliniques que pour le suivi des effets bénéfiques de nouveaux médicaments. Nous avons produit un mini-anticorps qui reconnaît les oligomères de Tau sur des coupes de cerveau provenant de patients décédés. Le but de ce projet est de modifier cette molécule afin de favoriser son passage au travers de la barrière entre le sang et le tissu cérébral. Cette modification se fera en lui ajoutant une séquence dite « cheval de Troie » facilitant sa pénétration dans le cerveau. Des études sur des oligomères de synthèse et sur des coupes de cerveau seront réalisées avant l'expérimentation animale afin de limiter celle-ci aux molécules qui présentent une réelle avancée dans notre projet. Nous ferons alors une étude en Tomographie par Emission MonoPhotonique (TEMP), chez le petit animal pour évaluer l'efficacité de ces nouvelles molécules pour détecter les oligomères de tau. Ceci permettra d'évaluer leur efficacité pour détecter plus tôt la MA chez l'homme. Dans ce projet, 208 souris seront utilisées : 76 souris transgéniques rTg4510, modèle de la tauopathie associée à la MA, ainsi que 132 souris du fond génétique, le nombre d'animaux par groupe expérimentaux étant limité à celui exigé pour produire des résultats convaincants au vue des tests statistiques. Toutes les expériences seront réalisées dans des conditions permettant de limiter au minimum le nombre d'animaux et de réduire au maximum, la douleur, la souffrance et l'anxiété des animaux. L'ensemble des protocoles expérimentaux est réalisé sous anesthésie profonde.

10854 L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est devenue au cours des deux dernières décennies un outil de plus en plus utilisé pour le diagnostic médical. Elle apparaît comme une technique de remplacement du scanner à rayons X du fait de son caractère non-traumatique, c'est à dire sans utilisation de radiations. De plus, elle permet d'obtenir d'excellentes images contrastées des différents organes au sein d'un animal indépendamment de leur profondeur. L'IRM permet d'obtenir des images avec de bonnes résolutions spatiales (atteignant jusqu'à 100 micromètres), parfaitement adaptées à l'étude chez le petit animal. Par ailleurs, l'IRM permet d'effectuer des études anatomiques et fonctionnelles. Son caractère non invasif permet d'analyser les systèmes biologiques *in vivo* en cherchant autant que possible à limiter la perturbation et l'influence de l'exploration sur le comportement de l'animal.

La plateforme IRM permet à de nombreux utilisateurs d'obtenir des images de petits animaux (rats, souris), de suivre des pathologies, d'étudier des phénomènes biologiques, etc ... Les équipes du laboratoire et des équipes de recherche extérieures ont accès aux aimants. Des collaborations ou des prestations de service seront menées. En effet, au regard de celles réalisées l'année précédente, ce nombre a été de 12.

La fréquence et le nombre d'études réalisées par an sera fonction des demandes de nos collaborations et des demandes émanant d'une activité de prestation de service.

Cependant, nous pouvons estimer que le nombre total maximum d'animaux pour les 5 prochaines années sera de 2100 souris et de 1100 rats, en accord avec le nombre maximum des animaux décrits dans les différents projets soumis, et sachant que la capacité d'hébergement maximale de l'animalerie est de 288 souris et 80 rats. Ce nombre a été réduit au minimum nécessaire, mais comprend l'ensemble des expériences qui seront menées sur 5 ans. De plus, il est possible qu'en fonction des résultats obtenus ce nombre soit revu à la baisse, tout en restant suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences.

Ceci permettra l'étude par IRM de différentes pathologies (comme l'ischémie cérébrale et du myocarde, l'athérosclérose, le cancer, etc.). Des contrôles sains seront nécessaires pour vérifier la validité des diagnostics IRM des animaux pathologiques. Les animaux seront dans des cages d'hébergement avec enrichissement (paille, coton, bois à ronger, tunnel ou maisonnette), de la nourriture et de l'eau à volonté. Des portoirs ventilés Easyflow seront utilisés. Les animaux sont maintenus à leur température physiologique via un système chauffant pendant toute la durée d'imagerie. Ils sont réhydratés et maintenus sous lampe chauffante post-imagerie jusqu'à leur réveil avant de regagner leurs cages collectives. Lors de l'imagerie, la fréquence respiratoire et la température corporelle sont suivies.

Si certains animaux entrent en état de souffrance, ils pourront être séparés et placés dans des cages individuelles. L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement. Des points limites et des critères d'arrêts seront définis pour chaque procédure pour chaque projet et par les porteurs de projet. Si certains animaux manifestent une douleur, de la souffrance ou un certain inconfort, ces dits animaux seront pris en charge par l'administration de médicaments adaptés, de soins et de techniques de nursing. Ceci sera réalisé par les porteurs de projet eux-mêmes.

En accord avec la règle des 3 R, les responsables de cette plateforme s'attachent à proposer des méthodes d'expérimentations non invasives et aussi raffinées que possible pour soulager au maximum l'inconfort des animaux.

La compréhension des processus biologiques décrits dans chaque projet nécessitant l'imagerie ne peut être obtenue que par le modèle animal.

Tous les animaux font l'objet d'un suivi quotidien réalisé par les expérimentateurs et le zootechnicien. Ce suivi sera accru pour les lignées de souris transgéniques susceptibles de présenter un phénotype dommageable et pour les animaux en cours d'expérimentation. Aucun animal ne sera laissé sans soin.

L'enrichissement de l'environnement des animaux, le maintien des interactions sociales et une surveillance quotidienne, permettront de limiter la souffrance des animaux et de s'assurer de leur bien-être.

10855 Notre molécule d'intérêt a été signalée dans l'environnement de nombreux tissus tumoraux et a été impliquée dans le contrôle du développement de certaines tumeurs cancéreuses. Notre travail a mis en évidence que la présence de cette molécule entraînait un retard de migration et d'invasion des cellules tumorales. Nous avons observé une inhibition de la croissance tumorale et du potentiel métastatique dans un type de cancer. Nous ne connaissons pas l'effet de notre molécule sur le développement d'un autre cancer chez la souris.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement des cellules cancéreuses dans un organisme entier vivant. Le comportement de ces cellules dépend de très nombreux facteurs et notamment de son microenvironnement direct. La souris a été choisie comme modèle car elle est parfaitement connue sur le plan anatomique et leur utilisation en est facilitée (maîtrise de l'anesthésie).

Le stress des animaux sera pris en charge : en respectant une période d'acclimatation de 7 jours après réception ; en hébergeant les animaux en groupe ; en conservant autant que possible les groupes formés afin de maintenir la stabilité hiérarchique établie ; et en leur mettant à disposition un enrichissement matériel spécifique à l'espèce utilisée afin de créer un environnement favorable (nid, jeu).

La douleur, la souffrance et l'angoisse infligées sont totalement prises en charge. Les souris sont anesthésiées, chauffées sous lampe et banc thermostaté pendant l'expérimentation. De plus, la manipulation se fait en dehors du champ de vision des animaux en attente. La température et l'hygrométrie sont relevées quotidiennement. La nourriture et l'eau sont vérifiées tous les jours.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place.

Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires le plus rapidement possible. Toute anomalie clinique sera rapportée au responsable sanitaire de l'établissement. Des mesures thérapeutiques seront prises pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés (injection de fluides / analgésiques, isolement, réchauffement, etc).

Le nombre d'animaux (40 par étude, 10 par condition expérimentale) est limité pour un total de 80 souris au maximum sur l'ensemble du projet. La survie des nouveaux nés déléétés pour le gène de notre molécule d'intérêt étant 5x inférieure aux souris sauvages, le nombre d'animaux utilisés est donc limité mais suffisant pour réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus.

10856 La maladie de parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative chronique en nombre de patients atteints. Le développement de différentes thérapeutiques symptomatiques et chirurgicales ont permis d'améliorer nettement la qualité de vie des patients, mais il existe toujours un manque de thérapeutiques capables de ralentir le développement de la maladie. Ce projet est destiné à mettre en œuvre des modèles animaux mimant les lésions de la maladie de Parkinson, afin d'évaluer les traitements médicamenteux innovants issus de la recherche et d'identifier des biomarqueurs qui pourront être utilisés lors des essais cliniques. Ces modèles sont basés sur l'utilisation d'une molécule neurotoxique qui induit une lésion spécifique des voies neuronales touchées dans la maladie de Parkinson, chez l'homme comme chez l'animal. Les rongeurs sont les espèces les plus couramment utilisées dans le domaine des maladies neurodégénératives. Ces espèces présentent l'avantage de fournir des souches stables et bien caractérisées ce qui permet une bonne reproductibilité des modèles et donc une optimisation du nombre d'animaux à inclure dans les études. Ce projet est développé exclusivement chez les souris, le rat étant moins sensible au MPTP du fait d'un métabolisme différent.

Ces modèles concernent des études soit de courte ou moyenne durée, soit de longue durée (plusieurs semaines).

Dans le premier cas il s'agira de modéliser des mécanismes physiopathologiques précis impliqués dans la maladie de Parkinson afin de valider les cibles biologiques travaillées. Dans le second cas,

il s'agira d'induire un développement progressif des phénomènes de neurodégénérescence afin de s'approcher au plus près du décours temporel de la maladie de Parkinson, pour étudier le potentiel thérapeutique de molécules, d'agents biologiques ou l'injection intra cérébral de vecteur viraux capables de moduler l'activité des protéines pathologiques impliquées dans le processus de neurodégénérescence. Dans ces différents modèles seront évalués des biomarqueurs en lien avec les manifestations cliniques de la maladie de Parkinson (motricité, coordination motrice, sensibilité ...), des biomarqueurs biochimiques (dans le sang ou le liquide céphalo-rachidien), et des biomarqueurs cérébraux (biochimiques et histologiques).

Notre établissement s'attache à réduire au maximum l'usage des animaux dans le développement de nouvelles thérapeutiques. Ainsi les candidats-médicaments ne sont évalués dans ce type de modèles qu'après un tri important via des méthodes de biochimie et biologie cellulaire *in vitro*, permettant de retenir les quelques candidats les plus prometteurs, qui présentent le meilleur index thérapeutique *in vitro* (rapport/activité/profil précoce ADME/toxicité potentielle). De plus ces modèles incluent à la fois des tests comportementaux et des mesures de paramètres biochimiques. Cela permet d'évaluer différents paramètres en parallèle réduisant ainsi le nombre d'études et permettant de corréliser ces différents marqueurs cliniques et biologiques. Ces informations sont nécessaires et indispensables pour la mise en œuvre des futurs essais cliniques de façon pertinente et sûre. Le cerveau est constitué de plusieurs types cellulaires différents qui interagissent pour la mise en œuvre des processus physiologiques mais aussi neurodégénératifs. Il présente de plus la particularité d'avoir une grande capacité de plasticité et d'être très dépendant de sa vascularisation. Cette dynamique du fonctionnement physiopathologique du cerveau et sa traduction en capacités mnésiques, associatives et motrices ainsi que le lien avec des biomarqueurs centraux et périphériques ne peuvent être évalués que par les études chez l'animal. A la demande du scientifique, un support du service biostatistiques sera apporté aux expérimentateurs pour l'élaboration du design expérimental, pour optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études et pour effectuer ou revoir les analyses statistiques.

Nous nous attachons à améliorer les conditions des études en optimisant les conditions d'hébergement (en particulier par l'enrichissement adapté aux besoins des rongeurs), en réduisant les contraintes de traitement par incorporation des produits dans la nourriture ou l'eau de boisson pour les études chroniques, quand cela est possible, en privilégiant les modèles transgéniques à phénotype non-dommageable, en utilisant les anesthésiques et analgésiques les mieux appropriés en cas de chirurgie pour préserver la validité du modèle tout en réduisant les douleurs liées aux incisions de la peau. Pour l'ensemble des procédures des points limites généraux et spécifiques sont identifiés. Cela permet au personnel en charge des expérimentations et des soins aux animaux (formé à l'observation des signes cliniques) d'identifier rapidement toute manifestation inattendue et de prendre les mesures nécessaires dans l'intérêt de l'animal. Ces études sont conçues et mises en œuvre par des personnels experts scientifiques formés spécifiquement à l'observation des animaux, et en lien constant avec les personnels de soins aux animaux, et les vétérinaires de l'établissement. Ces procédures sont discutées et approuvées par le comité d'éthique avant leur mise en œuvre, et celle-ci se fait en lien avec la structure chargée du bien-être de l'animal, afin de permettre une amélioration constante des conditions de recours à l'animal.

Le nombre maximal d'animaux utilisé dans le cadre de ces modèles est estimé à 1000 souris par an.

10857 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des affections immunitaires chroniques et progressives de la paroi du tube digestif avec des symptômes caractérisés par des douleurs abdominales, de la diarrhée et une perte de poids. La maladie de Crohn ou encore la rectocolite hémorragique sont des MICI. Les patients atteints par ces affections font face à une forte diminution de leur qualité de vie et leur prise en charge passe par l'utilisation de médicaments ne permettant cependant pas la rémission de la maladie et ne garantissant pas la qualité de vie pendant les phases de poussées inflammatoires.

Chez ces patients, et encore plus en cas d'obésité, la flore microbienne intestinale, aussi appelée microbiote intestinal, est altérée et pourrait jouer un rôle important dans le développement de ces maladies.

Ce microbiote constitue donc une cible thérapeutique importante. Certains extraits végétaux issus de la pharmacopée européenne ont déjà montré des effets bénéfiques et protecteurs sur le microbiote intestinal et pourraient permettre d'améliorer la qualité de vie des patients atteints de MICI.

L'objectif de ce projet est d'étudier les bénéfices apportés par différentes formulations innovantes d'extraits végétaux sur la prévention du développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin dans un modèle murin et de mieux comprendre l'importance du microbiote intestinal dans le développement de l'inflammation.

Chez la souris il est possible d'induire des MICI présentant des similitudes avec les MICI humaines en nourrissant les animaux avec une alimentation riche en gras couplée à l'ajout d'un produit irritant pour le tube digestif dans l'eau de boisson sur une courte période.

Ce projet de type nutritionnel nécessitera l'utilisation de 70 souris sur une durée de 6 mois. Ce nombre est choisi de manière à obtenir les réponses attendues en ayant recours à des effectifs les plus petits possible. Pour cela le projet se base sur la littérature scientifique existante, utilise des outils de calcul statistique (a priori et a posteriori) et privilégie les méthodes non terminales permettant les suivis longitudinaux des animaux. Les modèles *ex vivo*, *in vitro* et *in silico*, bien que très utiles sur certains aspects et indispensables au principe de remplacement, ne permettent pas encore d'obtenir une approche globale aussi complexe que celle du microbiote intestinal dans son environnement, ici le tube digestif d'un mammifère, pour approcher au plus près de la réalité retrouvée chez l'homme.

Dans ce projet, l'utilisation d'un modèle murin de petite taille (souris) est privilégiée aux plus grandes espèces en permettant l'induction d'un stress métabolique (obésité / diabète en quelques semaines comparativement à de plus grosses espèces pour lesquelles plusieurs mois seraient nécessaires). L'utilisation de souris en première intention permet par conséquent de réduire la durée d'exposition aux situations douloureuses des animaux dans le temps ce qui participe au principe de raffinement. L'évolution des signes d'inflammation sera évaluée quotidiennement à partir des fèces des animaux. En cas d'évolution trop avancée, les souris seront sorties de l'étude. Les différents tissus obtenus au cours de ce projet seront stockés pour permettre des analyses ultérieures et éviter de devoir recourir à un projet similaire dans le temps.

L'ensemble de ces dispositions favorisent le principe de réduction, raffinement et remplacement de l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques.

10858 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe une fibre à visée thérapeutique dans le domaine des troubles du transit (composé X). Ainsi, le principal objectif de la présente étude est d'évaluer les effets du composé X sur le temps de transit total ainsi que sur la fréquence d'émission et la qualité des fèces chez le rat sauvage en condition normale et de constipation expérimentalement induite.

L'étude consistera en trois phases successives :

- une phase de 6 jours d'acclimatation à l'animalerie après réception.
- une phase de 5 jours d'habituation à la voie d'administration du composé X (voie orale).
- une phase de 3 jours de traitement pendant laquelle sera déterminé l'impact du composé X sur la fonction digestive (temps de transit total, fréquence d'émission et degré d'hydratation des fèces). Pendant cette phase de traitement, la moitié des animaux recevront un traitement connu pour induire un état de constipation modéré (injections répétées de l'opéramide à faible dose), alors que l'autre moitié sera laissée en conditions basales (non constipés).

Un total de 60 rats Wistar composera cette étude, avec les groupes expérimentaux suivants :

Groupe 1 (état non constipé) : Véhicule / Véhicule (n=15)

Groupe 2 (état non constipé) : Composé X / Véhicule (n=15)

Groupe 3 (état constipé) : Véhicule /Lopéramide (n=15)

Groupe 4 (état constipé) : Composé X / Lopéramide (n=15)

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

- Raffinement : Le modèle animal envisagé est un modèle rat (souche Wistar) qui est particulièrement bien documenté dans la littérature pour ce type d'étude et que nous avons reproduit à de nombreuses reprises au sein du laboratoire. Le choix du modèle rat a été validé avec le client suite à la caractérisation précise du modèle établi. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Un enrichissement des cages d'hébergement sera assuré par l'ajout de briquettes en bois. Enfin, bien que le protocole soit peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés par groupe a été calculé au minimum de façon à pouvoir mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude du transit intestinal et de la qualité des fèces produites après un traitement.

10859 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie fréquente et grave où le poumon est progressivement remplacé par une cicatrice rigide et n'assurant pas les échanges gazeux.

Une famille de cellules appelées fibroblastes joue un rôle de premier plan dans le développement de la fibrose. Nos travaux préalables réalisés *in vitro* et à partir de prélèvements humains suggèrent qu'une protéine appelée ici CIBLE joue un rôle majeur dans l'activation des fibroblastes dans cette maladie.

L'objectif principal de ce projet est de faire la preuve que la diminution de l'expression pulmonaire de CIBLE protège du développement de la fibrose pulmonaire induite par l'administration dans le poumon de bléomycine, un médicament anticancéreux, chez la souris. L'expression de CIBLE dans le poumon sera réprimée par l'administration, par voie intrapéritonéale et sous forme d'aérosols inhalés, d'un médicament innovant composé de nanoparticules, ou nanomédicament.

Les objectifs secondaires seront 1) de comparer l'effet de la voie aérosolisée à la voie injectable, 2) de comparer l'effet du nanomédicament à celui d'un traitement de référence de la FPI, le nintedanib, 3) de préciser les mécanismes par lesquels le nanomédicament protège du développement de la fibrose, et 4) de valider l'effet antifibrosant du nanomédicament dans un autre modèle de fibrose pulmonaire, induite par l'exposition aux rayons X.

Ces résultats permettront de tester une nouvelle famille de traitements, applicables à la fibrose pulmonaire idiopathique mais aussi à de nombreuses autres maladies fibrosantes atteignant d'autres organes.

Le nombre total de souris nécessaires pour mener à bien ce projet est de 590.

Les expérimentations ont été planifiées selon la règle des « 3R ». Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser un organisme entier, par conséquent des modèles animaux sont nécessaires pour faire la preuve d'une nouvelle thérapeutique. Réduire : les expériences ont été planifiées dans un ordre précis pour réduire le nombre d'animaux. Le nombre d'animaux pour obtenir des résultats robustes a été calculé en fonction des tests statistiques utilisés et de la survie attendue des animaux. Raffiner : Les administrations par voie trachéale seront réalisées sous anesthésie générale. Les animaux seront élevés en communauté dans des cages enrichies par la présence de boîtes à oeufs, et surveillés quotidiennement. Les animaux sont euthanasiés à la fin de l'expérimentation. Les prélèvements sont effectués après la mort de l'animal.

10860 La pneumopathie à *Streptococcus pneumoniae* reste une des principales causes de mortalité d'origine infectieuse. Le recours à la ventilation mécanique (VM) s'impose dans 20% des cas, avec une mortalité atteignant 50%. La VM génère des dommages tissulaires qui facilitent la dissémination

bactérienne. L'étude de nouvelles voies physiopathologiques participant à la gravité est un préalable à la découverte de nouvelles pistes thérapeutiques.

Les mitochondries régulent les fonctions microbicides et inflammatoires des cellules immunitaires. Des données expérimentales et cliniques soutiennent qu'il existe une dysfonction mitochondriale au cours des infections sévères. L'effet de la VM n'a jamais été investigué.

Les objectifs sont :

- 1) Caractériser la fonction mitochondriale et ses mécanismes régulateurs dans différents compartiments (poumon, foie, sang) au cours de la VM, la pneumopathie, et les 2 associées.
- 2) Corréler ces anomalies au devenir clinique (dysfonction des organes, mortalité), à la réponse inflammatoire et la clairance bactérienne.

Une attention particulière sera portée à la règle de 3R :

Le Remplacement du modèle in-vivo est limité par les difficultés d'accès au poumon en recherche clinique, et des résultats discordants obtenus avec un modèle *in vitro* sur cellules pulmonaires étirées, qui ne permet pas de reproduire l'infection, la réponse immunitaire et les conséquences extra-pulmonaires qui conduisent au décès.

Le lapin est un modèle privilégié pour une VM prolongée par les voies naturelles. La VM de plus petits animaux nécessite une trachéotomie, est limitée dans le temps (maximum 6h), et se complique fréquemment (lésions pulmonaires, risque hémorragique et vital). Un cathéter veineux central maintenu par un gilet permet de s'affranchir de ponctions veineuses itératives tout en permettant la libre circulation de l'animal dans la cage. Les animaux seront hébergés à température réglée (l'animal ventilé sur tapis chauffant à 39°C).

Dans un objectif de Réduction, le nombre d'animaux choisi (5/groupe) est le nombre minimal déterminé par des études préliminaires pour permettre une analyse statistique intergroupes. Le nombre de lapins sera de 63 sur 2 ans (12 groupes de 5, et 5% de perte), permettant de comparer différentes conditions :

- VM à 2 niveaux d'étirement (protectrice (volume 6ml/kg) et agressive (20ml/kg) et pneumopathie. Les deux niveaux sont requis pour attribuer l'effet propre à la VM, et non au reste de la procédure (anesthésie continue, jeun, oxygénothérapie, facteurs connus pour impacter la fonction mitochondriale).

- Deux temps d'évaluation (6 et 24h) : nos résultats et d'autres montrent un phénomène dynamique, les signaux « danger » mitochondriaux étant libérés précocement (4 à 8h) pour activer l'immunité, et les mécanismes régulateurs s'observant dès 24 heures.

Dans un objectif de Raffinement, chaque procédure (intubation, ventilation, inoculation, autopsie) sera réalisée sous anesthésie générale. Dans notre modèle, la mortalité est observée uniquement pour les animaux infectés ventilés qui resteront sous anesthésie générale de l'intubation jusqu'au décès. Un scope permettra de dépister les variations de fréquence cardiaque et une possible dysfonction d'anesthésie pour y remédier rapidement. L'animal non ventilé sera surveillé par une caméra, permettant de dépister les troubles du comportement ou de la respiration.

Une évaluation rétrospective sera effectuée à la fin du projet.

- 10861** La douleur a été étudiée sur une variété importante de modèles animaux et la quasi-totalité des antalgiques disponibles actuellement sur le marché ont été testés dans des modèles précliniques chez le rongeur. Ces modèles tendent à mimer des conditions douloureuses décrites chez l'humain, en induisant maladies ou blessures traumatiques, fournissant ainsi des systèmes intégrés utiles à l'étude de situations douloureuses diverses. Si les animaux sont incapables d'auto-évaluation, leurs comportements en réponse à des stimuli nociceptifs peuvent être étudiés de façon fiable et objectivement quantifiés (dimension sensori-discriminative de la douleur). Parallèlement, certains comportements spécifiques peuvent également suggérer la présence de douleur spontanée. La douleur a enfin une composante émotionnelle et cognitive, limitant la capacité des patients souffrant de douleurs chroniques à réagir convenablement aux tâches de la vie quotidienne (anxiété, dépression, qualité de vie altérée). Ces composantes sont difficilement appréhendables chez

l'animal mais un intérêt croissant existe pour ces nouvelles approches comportementales visant à évaluer des déficiences émotionnelles et cognitives associées à des douleurs chroniques.

L'activité de la société s'inscrit dans ce cadre, visant à évaluer les propriétés antalgiques de nouvelles molécules provenant de l'industrie pharmaceutique majoritairement. L'offre s'appuie sur une sélection de modèles rongeurs mimant diverses pathologies douloureuses couvrant différentes aires thérapeutiques (neuropathies, pathologies articulaires, gastroentérologie, cancer, douleur post-opératoire, ...) et une diversité de tests comportementaux permettant d'appréhender les multiples composantes de la douleur. Les études d'efficacité antalgique sont exclusivement réalisées chez le rongeur (rats et souris), offrant des mesures robustes et reproductibles sur la base de modèles parfaitement décrits, calibrés et admis par la communauté scientifique.

Les activités de la société s'inscrivent dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Si des méthodes alternatives existent lors des phases précoces de développement d'une molécule (modélisation informatique, ingénierie tissulaire, cellules souches), l'avancement de la caractérisation de la molécule d'intérêt ne permet pas à l'heure actuelle de remplacer l'étude de son efficacité chez l'animal vigile. Pour la société, les progrès méthodologiques et technologiques couplés aux avancées de la connaissance scientifique permettent d'une part de raffiner les modèles animaux existants et d'autre part de développer et proposer des modèles *in vivo* toujours plus proches des situations cliniques (induction de pathologies, mesures des composantes multiples de la douleur). Le raffinement passe également par la réduction autant que possible de la souffrance et du stress des animaux et l'amélioration de leur bien-être. Enfin, pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Dans le cadre de ce projet regroupant les activités de service et de R&D de la société, une estimation présentée en détail pour chaque procédure montre que le nombre d'animaux qui seront utilisés pour la totalité du projet (5ans) est de 32400 (incluant les parties 1 et 2 du projet), soit 6480 rongeurs par an environ.

L'objectif des études réalisées par la société est de fournir à ses Clients des résultats scientifiques, générés dans le respect systématique des normes éthiques les plus élevées, sur l'intérêt de molécules antalgiques destinées au traitement de diverses pathologies douloureuses chez le patient.

10862 L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est aujourd'hui encore un problème majeur de santé publique. On estime à près de 400 millions le nombre de porteurs chroniques de ce virus dans le monde. L'infection chronique est associée à des lésions hépatiques d'intensité diverse, aboutissant à une hépatite chronique active. Cet état pathologique du foie peut induire une cirrhose qui dans environ 20% des cas conduit à un carcinome hépatocellulaire (CHC). Des données épidémiologiques ont d'ores et déjà permis de lier l'infection par le VHB à une probabilité accrue de développer un cancer hépatocellulaire. L'incidence de ces cancers est pour partie due à l'inflammation induite par l'infection virale mais elle découle également d'un effet direct de certaines protéines virales sur le foie du patient infecté. Malgré plusieurs études *in vitro*, de nombreuses questions restent en suspens sur le mécanisme d'action d'une des protéines du VHB au cours et dans la pathogenèse hépatique.

Notre projet de recherche a pour objectif de développer des travaux, *in vivo*, sur la caractérisation des propriétés biologiques d'une protéine du VHB exprimées dans le foie de souris. Ils permettront d'évaluer l'impact de l'expression de cette protéine du VHB dans un organe entier (le foie) dans une situation clinique proche de celle retrouvée chez les patients infectés par le VHB. Le modèle d'étude sera celui de la souris CF57Bl6 qui permettra de générer un environnement immuno-pathologique proche de celui observé au cours de l'infection chez l'homme. Une meilleure connaissance des mécanismes responsables de l'évolution de la maladie hépatique vers le CHC devrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutique pour lutter contre cette affection.

Dans ce contexte l'utilisation d'animaux est l'approche la plus appropriée, les objectifs du projet ne permettant pas l'utilisation de méthode substitutive. Nous possédons la faisabilité technique et l'expérience permettant de réaliser les différentes procédures présentées. Ceci nous permettra de réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaire (200 animaux prévu sur 5 ans). Au cours de

l'expérimentation, le suivi des animaux permettra, si nécessaire, de réduire, supprimer ou soulager l'anxiété, la douleur ou la détresse des animaux. Deux différentes lignées de souris C57Bl6 exprimant ce même transgène sont déjà disponibles (sans phénotype dommageable).

10863 Le porc est une espèce assez prolifique et le grand nombre de porcelets au sevrage nécessite des soins et une attention particulière. Dans les conditions habituelles d'élevage, les porcelets sont sevrés relativement jeunes et encore non totalement matures du point de vue digestif et immunitaire. Les antibiotiques ont donc été largement utilisés pour préserver la santé des porcelets lors de cette période de fragilité importante. Face à l'émergence des risques d'antibiorésistance, le recours aux antibiotiques est en voie de réduction en élevage. Des efforts restent à accomplir et les recherches de solutions alternatives de type nutritionnel permettant d'œuvrer dans ce sens sont à poursuivre. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'intérêt d'une supplémentation accrue en acides aminés, les constituants des protéines, pour aider le porcelet à passer le cap délicat du sevrage, en raison de l'implication de ces acides aminés dans la préservation de tube digestif et du système immunitaire. Cette étude compare l'effet d'un régime alimentaire enrichi en plusieurs acides aminés identifiés comme potentiellement intéressants, distribué à des porcelets dans les jours qui suivent le sevrage à celui d'un régime témoin dans lequel l'apport de ces acides aminés, uniquement par les protéines des matières premières, correspond aux apports habituels. Les effets des régimes seront évalués sur la croissance, la consommation alimentaire, le comportement et les troubles digestifs des porcelets, espèce cible de l'étude. Ce type d'étude nécessite d'être réalisé sur l'espèce porcine et sur animaux (Remplacement). Les conditions d'élevage doivent être contrôlées de façon à satisfaire les besoins de confort des porcelets à ce stade, en termes de logement, d'alimentation, d'abreuvement et conditions d'ambiance (Raffinement). Cet essai implique l'utilisation de 240 animaux répartis en 2 groupes expérimentaux (1 par régime) de 120, effectif considéré comme nécessaire pour une exploitation statistique des données à partir d'expériences menées dans des conditions similaires (Réduction). Les performances et la santé des animaux seront suivies de façon régulière. Les porcelets sont sevrés à l'âge de 4 semaines puis suivis pendant 5 semaines et demie. Des prélèvements de sang en nombre réduit (Réduction) seront réalisés pour de dosage d'indicateurs de santé des animaux. Les animaux seront suivis par du personnel expérimenté (Raffinement).

10864 Les glomérulonéphrites (GN) à complexes immuns, comme la néphropathie à IgA ou la maladie rénale liée au lupus, sont un groupe de maladies du rein caractérisées par des lésions responsables d'une destruction du tissu rénal, entraînant ainsi une mauvaise filtration du sang et une accumulation de molécules toxiques dans le sang. Ces maladies peuvent être graves menant à une destruction définitive du rein appelée insuffisance rénale chronique terminale (par conséquent la nécessité de dialyse ou de transplantation rénale) mais également un risque de décès des patients atteints. Comme, actuellement, il n'existe pas des médicaments pour traiter ces maladies, nous sommes dans la nécessité de mettre en place un traitement spécifique qui pourrait protéger les reins. L'activation des cellules de sang jouent un rôle essentiel dans le développement de la maladie et jouent un rôle majeur dans la destruction des reins. Nous avons développé des molécules qui inhibent l'activation de ces cellules sanguines. En revanche, nous ne pourrions pas les tester directement chez les patients avant de tester leur efficacité chez l'animal.

Le but de ce projet est donc premièrement de transférer les cellules sanguines des patients chez des souris qui ne possèdent pas de cellules endogènes (nommées NSG) et ensuite injecter la molécule inhibitrice dans le but d'évaluer son effet sur l'état d'activation de ces cellules ainsi que l'état des reins après la mise à mort de la souris.

Ce projet se déroulera sur une période de 2 ans.

Ce projet nécessitera un nombre total de 140 souris.

La conformité avec les exigences de réduction, raffinement et remplacement seront pris en compte :
1) Remplacement : les connaissances issues de cette étude *in vivo* ne peuvent pas être obtenues actuellement par d'autres méthodes compte-tenu de la complexité physiologique de la réponse

inflammatoire qui nécessite de travailler à l'échelle d'un organisme. En revanche, nous avons également établi des lignées cellulaires pour étudier les mécanismes *in vitro*.

2) Réduction : nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant dans chaque sous-groupe pour avoir des résultats statistiquement exploitables à 30 animaux par sous-groupe ; les expériences qui ont le même groupe contrôle sont effectuées en simultané pour limiter le nombre des souris contrôles. 3) Raffinement : les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Une anesthésie sera effectuée lors des procédures douloureuses pour l'animal et l'utilisation d'antalgiques sera systématique si l'animal présente des signes de douleur au cours de l'expérimentation. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligées aux animaux, les animaux seront évalués à l'aide de points limites bien définis, entraînant l'arrêt anticipé de l'expérimentation si nécessaire.

A terme, ce projet pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques permettant de mieux prendre en charge le lupus chez l'homme.

10865 L'obésité a atteint des proportions épidémiques dans les pays industrialisés. Elle se caractérise par une accumulation anormale de lipides dans l'organisme. C'est pourquoi elle s'explique, en partie, par une consommation excessive de lipides. De plus, il est maintenant admis que l'obésité est une maladie inflammatoire chronique dite de « bas bruit », c'est à dire de faible intensité.

La participation de la sphère oro-digestive dans la mise en place de l'obésité a été longtemps ignorée. Pourtant, elle conditionne la préférence pour les lipides alimentaires (papilles gustatives) et la biodisponibilité des lipides alimentaires à l'organisme, via la sécrétion de lipoprotéines (chylomicrons, CM) riches en triglycérides (TG) (intestin grêle). De plus, l'intestin est une porte d'entrée de facteurs pro-inflammatoires provenant du microbiote intestinal comme par exemple les lipopolysaccharides (LPS), issus de la paroi cellulaire des bactéries Gram (-). Or, il a été démontré que les régimes hyperlipidiques favorisent l'inflammation intestinale et l'entrée du LPS dans l'organisme. Ce qui peut expliquer que les régimes hyperlipidiques puissent être à l'origine de l'inflammation retrouvée en cas d'obésité.

La réponse inflammatoire implique l'activation de complexes protéiques appelés « inflammasome ». L'inflammasome NLRP3 est le plus connu des inflammasomes, il est exprimé dans l'intestin, est activé par les lipides et contrôle la perméabilité intestinale.

C'est pourquoi l'objectif de ce travail est de répondre aux questions suivantes :

Quel est le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans la mise en place de l'obésité induite par un régime riche en lipide ? Quelle est la contribution de la sphère oro-intestinale (détection orale et absorption intestinale des lipides alimentaires ?)

Pour ce faire, des souris déficientes en NLRP3 seront nourries soit avec un régime standard ou hyperlipidique et seront comparées aux souris sauvages (contrôles). Nous évaluerons l'évolution de la masse grasse, la dépense énergétique, la préférence pour le gras et les capacités d'absorption intestinale des lipides.

Ce projet est en adéquation avec la règle des 3R : Le remplacement est impossible car il s'agit d'étudier des processus physiologiques mettant en jeu plusieurs organes (langue, intestin et tissu adipeux). Il est donc indispensable de recourir au modèle animal pour une approche intégrée. Un total de 80 animaux sera utilisé. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum requis pour assurer la fiabilité des analyses statistiques. En ce qui concerne le raffinement, les animaux seront hébergés dans des conditions optimales avec un enrichissement de leur milieu (Frisotis en carton) et bénéficieront d'un suivi quotidien de leur état général. Lors des procédures expérimentales, les actes susceptibles d'entraîner une souffrance ou une douleur seront réalisés sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle grâce à une table chauffante spécifique. S'agissant d'un projet nécessitant l'utilisation d'animaux vivants, les questions d'éthiques en expérimentation animale et la règle des 3R sont abordées en tant que sujet à part entière. En effet, l'utilisation de techniques non invasives indolores et de tests comportementaux est privilégiée afin d'acquiescer les paramètres physiologiques nécessaires au projet. Des points limites en adéquation avec ce projet ont été définis (signes généraux de souffrance, perte de poids supérieure à 20% en

quelques jours, ou poids excessif gênant la locomotion). En cas d'atteinte d'un de ces points limites l'animal concerné sera retiré du projet. Un nombre restreint d'expérimentateurs disposant d'une formation et d'une qualification adéquate à l'expérimentation animale, interviendra dans ce projet.

10866 Dans le système nerveux central, la conduction nerveuse, rapide et saltatoire, est permise grâce à la gaine de myéline qui entoure les neurones. Le processus de formation de cette gaine, appelée myélinisation est hautement régulé. Il est composé de plusieurs étapes distinctes telles que la prolifération, la migration, et la différenciation, d'une population de cellules nommées oligodendrocytes. Des études ont mis en évidence l'implication de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) dans la survie des oligodendrocytes. Les travaux menés sur son effet au cours des processus de myélinisation ont été restreints aux étapes de prolifération et de migration des oligodendrocytes ; et l'influence du tPA sur les processus de différenciation de la lignée oligodendrocytaire n'a pas été encore étudié.

Le but de ce projet est donc de mieux comprendre l'implication du tPA dans les processus de différenciation de la lignée oligodendrocytaire.

Pour ce faire, dans un premier temps, nous utiliserons un modèle de souris sauvages et déficientes pour le tPA de manière constitutive (tPA Knock-Out). La lignée oligodendrocytaire sera analysée à différents stades pré- et post-nataux grâce à différentes techniques.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action du tPA au cours des processus de myélinisation et de ses incidences à l'âge adulte, une seconde partie du projet consistera à utiliser un modèle d'électroporation *in utero*. Ce dernier sera combiné à l'utilisation de différents vecteurs chez des souris sauvages et déficientes en tPA de manière constitutive ou conditionnelle (tPA^{lox/lox}) ce qui nous permettra de surexprimer ou d'invalider l'expression d'un gène à un moment précis du développement et grâce à l'utilisation de protéines fluorescentes, de pouvoir suivre sa localisation subcellulaire au sein des oligodendrocytes. Dans un premier temps, nous mettrons cette technique au point puis, dans un second temps, les animaux seront récupérés à différents stades pré- et post-nataux et des analyses *in vivo* ou en *ex vivo* seront réalisées.

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

La souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine du développement. La communauté scientifique dispose pour ces études d'un modèle animal permettant de suivre les processus de myélinisation. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ce modèle rend la souris particulièrement intéressante pour notre étude. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale. Avant de procéder à une telle étude, nous nous assurons d'utiliser le nombre minimal d'animaux adéquat pour atteindre le résultat souhaité. Ainsi, les procédures expérimentales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés pendant tout le projet. Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Le bien-être des animaux est contrôlé 7j/7 par du personnel qualifié. Cette surveillance quotidienne et hebdomadaire permet de détecter tous signes cliniques de souffrance (douleur, perte de poids ...) et d'agir rapidement pour mettre fin à cette détresse. Les animaux seront anesthésiés durant la chirurgie. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire montre que les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun signe de mal être. En vue de minimiser la douleur et la détresse, et d'améliorer le bien-être des animaux utilisés dans ces études, des soins particuliers seront tout de même appliqués aux conditions d'élevage par rapport à des conditions standards, (animaux hébergés seuls par cage, placement de la nourriture sous forme de bouillie à une hauteur réduite).

En prenant en compte ces recommandations, un total de 1076 souris sera utilisé lors de ce projet.

10867 En France comme dans d'autres pays, les porcs sont fréquemment porteurs sains de souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*) résistantes à des antibiotiques critiques pour la santé humaine, les céphalosporines de troisième génération. Le portage intestinal de ces bactéries résistantes est un danger pour la santé animale, si les gènes de résistance sont transmis à une souche pathogène. Ces souches résistantes peuvent aussi contaminer les carcasses lors de l'abattage et risquer ensuite de coloniser ou d'infecter le consommateur. Nous souhaitons développer un modèle de portage digestif de souches résistantes aux céphalosporines de troisième génération chez le porc. Ce modèle sera utilisé dans des projets futurs pour tester différentes solutions visant à réduire le portage de ces souches résistantes.

Pour cela, des porcelets âgés de quatre semaines seront inoculés ou non, par voie orale, à l'aide de souches de *E. coli* résistantes aux céphalosporines de troisième génération. Deux souches seront testées. Chaque souche sera inoculée à quatre porcelets, et quatre autres porcelets seront des animaux témoins non inoculés, soit 12 porcelets au total. Les animaux seront gardés pendant quatre semaines maximum après inoculation. Ils seront observés quotidiennement pour noter d'éventuels symptômes. Des prélèvements de matières fécales seront collectés régulièrement. Les résultats permettront de choisir, en fonction des signes cliniques observés et des résultats d'analyses des prélèvements fécaux, la souche non pathogène et fortement colonisatrice qui sera utilisée dans les essais futurs.

Ces résultats ne peuvent être obtenus que par expérimentation sur l'espèce cible. Le protocole expérimental ne devrait pas entraîner de la souffrance animale, car les souches utilisées seront choisies parmi des souches ne présentant pas de facteurs de virulence. Dans un but de réduction, compte tenu de notre expérience, le nombre d'animaux est calculé de manière à obtenir des résultats significatifs en utilisant un minimum d'animaux par lot. Les inoculations sont faites par voie orale. Les animaux sont vus au moins une fois par jour ; ils sont élevés en groupe, disposent d'objets manipulables, ont accès à l'alimentation et à de l'eau à volonté, ont de la lumière de 7 h 30 à 18 h 00 et disposent de lampes chauffantes ainsi que des plaques de couchage. Ils sont pesés chaque semaine et leur température corporelle est mesurée chaque jour, afin de suivre l'évolution de leur état de santé. Afin de réduire le stress des animaux, les prélèvements sont collectés lors des prises de température. Le remplacement n'est pas envisageable, les animaux utilisés sont nécessaires pour la mise au point du modèle de portage digestif des souches bactériennes.

10868 Le microbiote intestinal ou flore intestinale représente l'ensemble des microorganismes de l'intestin et joue un rôle crucial dans la réponse immunitaire. En effet, les changements dans la composition de cette flore intestinale et les modifications du bon fonctionnement du tube digestif (qui influence le transfert des composants de la flore depuis le tube digestif vers le sang) influencent fortement la réponse immunitaire pendant les périodes de stress. L'impact de la flore intestinale sur les réponses immunitaires de l'hôte ne se limite pas au compartiment intestinal mais s'étend au compartiment sanguin et aux muqueuses, comme les poumons. En effet, la flore intestinale peut agir à distance sur les mécanismes de défense de l'hôte pour contrôler les infections respiratoires.

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

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

Le primate non humain (PNH) est un excellent modèle pour étudier les conséquences physiopathologiques de la grippe. Seul ce modèle permet de reconstituer les interactions entre un pathogène et son hôte et notamment son système immunitaire. La physiologie (dont la composition

du microbiote) et le système immunitaire du macaque sont proches de ceux de l'Homme et caractérisés. Aucune méthode alternative n'existe à ce jour.

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

10869 La radiothérapie est l'une des méthodes les plus efficaces et les plus utilisées pour traiter les cancers. Au moins 70 % des patients atteints d'un cancer seront traités par radiothérapie durant leur maladie.

Le principal défi de la radiothérapie est de parvenir à déposer une dose curative dans la tumeur tout en s'assurant que les tissus sains environnants soient préservés dans leur intégrité. Ceci est d'autant plus crucial pour les tumeurs radio-résistantes comme les gliomes (tumeurs cérébrales), qui sont actuellement traitées uniquement de façon palliative.

Dans ce contexte, notre objectif principal s'inscrit dans l'amélioration des traitements de radiothérapie. Dans le cadre de ce projet, nous nous focaliserons sur l'une de ces techniques innovantes qui a montré dans des études préliminaires un intérêt significatif dans la préservation des tissus sains (même à des doses très élevées) ainsi qu'un effet très intéressant sur le contrôle de la croissance tumorale chez le rat.

Notre critère d'évaluation pour l'efficacité de cette technique va porter sur la préservation des tissus sains aussi bien au niveau histologique que fonctionnel. Aussi, le recours à des méthodes alternatives n'est pas envisageable dans ce projet et il nous est indispensable de développer des modèles animaux.

Pour la réalisation de ce projet, 20 rats seront nécessaires. 10 rats seront irradiés au niveau de l'ensemble du cerveau excepté les bulbes olfactifs et le cervelet (l'hippocampe sera alors particulièrement touché) et 10 autres ne seront pas irradiés et serviront de contrôle. Le nombre d'animaux a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible. Notre projet va nécessiter de travailler sur des rats chez lesquels la taille plus importante du cerveau va être plus adaptée aux types d'irradiations proposées dans le cadre des procédures expérimentales.

L'effet de ces nouvelles modalités de radiothérapie ne peut pas être évalué *in vitro* puisque le principal critère d'évaluation est leur impact sur la préservation des tissus sains et des fonctions cérébrales. De même, les mécanismes inflammatoires et vasculaires induits par l'irradiation ne pourront être étudiés que dans la globalité d'un organisme vivant intégré. L'évaluation passera également par le suivi des effets cliniques liés à l'irradiation (nécrose liée au rayonnement, cicatrisation, signes neurologiques, comportement...). Pour ces raisons, le recours à des méthodes alternatives est impossible dans ce projet.

En accord avec les réglementations internationales dans le domaine de la cancérologie, les conditions d'hébergement des animaux sont optimisées pour limiter leur stress, avec par exemple, l'ajout d'éléments de raffinement comme des rondins de bois ou de coton dans les cages.

Les effets toxiques ne sont pas encore connus puisqu'il s'agit d'expériences pionnières. Les animaux seront néanmoins observés quotidiennement pour déceler d'éventuels signes de détresse ou de mal-être et des mesures adéquates seront prises pour arrêter immédiatement leur souffrance.

10870 Les coccidioses des volailles sont des affections très fréquentes dues à des parasites du genre *Eimeria*. Elles ont des conséquences économiques et sanitaires importantes, notamment dans les élevages de dindes (*Meleagris gallopavo*). Si des mesures d'hygiène rigoureuse peuvent réduire le risque, elles sont le plus souvent insuffisantes. Au contraire du poulet (*Gallus gallus*), les approches vaccinales ne sont pas disponibles aujourd'hui dans l'Union Européenne. Les approches préventives par usage d'anticoccidiens dans l'aliment sont donc d'usage très courant et peuvent conduire à l'émergence de résistances chez les coccidies, réduisant l'intérêt et l'efficacité de ces molécules. Selon les recommandations de la Commission Européenne, le développement et l'évaluation d'alternatives aux méthodes existantes est nécessaire. Le but de cette étude est d'évaluer des produits susceptibles d'enrichir les moyens de lutte contre les coccidioses, dans un modèle de reproduction expérimentale de la coccidiose chez la dinde.

Dans l'état actuel des connaissances, l'évaluation de l'activité anticoccidienne repose uniquement sur la comparaison des performances de croissance et la description des lésions intestinales, d'où la nécessité d'utiliser les oiseaux dans un modèle d'infection expérimentale.

En raison d'une durée de vie limitée des oocystes (forme de résistance du parasite à l'origine de l'infection des oiseaux), la multiplication sur oiseaux pour produire de nouvelles générations de parasites indispensables à toute étape d'évaluation de solutions alternatives reste la seule méthode permettant de disposer de parasites frais et en quantités suffisantes.

Pendant les 5 années du programme et pour toute la procédure de multiplication, 210 dindons au maximum, recevront des doses faibles permettant de multiplier les parasites sans entraîner de symptômes ou douleurs.

Pour les souches de coccidies collectées du terrain, une évaluation de leur capacité à provoquer la maladie est réalisée afin de déterminer le nombre d'oocystes à inoculer aux oiseaux pour reproduire une coccidiose clinique modérée. Ainsi, durant cette phase, 315 dindons au maximum recevront des doses croissantes de coccidies afin de déterminer cette dose maximale d'oocystes à utiliser.

Enfin, sur les 5 années du programme, au maximum 810 oiseaux seront inoculés avec le nombre d'oocystes le plus faible pour reproduire une coccidiose modérée (affectation légère du comportement et diarrhée modérée ne durent pas plus de 2 à 3 jours et régressant spontanément) afin d'évaluer des solutions alternatives aux anticoccidiens actuels.

Au final, ce projet permettra sur 5 ans d'évaluer près de 30 solutions alternatives, à base d'extraits végétaux, d'huiles essentielles, etc, permettant de proposer de nouveaux moyens de lutte contre la coccidiose du poulet.

Ce projet permettra aussi d'évaluer l'évolution du pouvoir infectieux des souches isolées du terrain et la mise en évidence d'éventuelles résistances aux anticoccidiens actuels.

Au total, sur 5 ans, au maximum 1335 dindonneaux obtenus auprès de couvoirs conventionnels et élevés par lots successifs seront utilisés pour l'ensemble des trois procédures.

Tous les efforts en vue de réduire le nombre d'animaux seront entrepris lors des différentes expérimentations. Ainsi, pour la procédure de multiplication des coccidies, pour les espèces les plus prolifiques, le nombre d'oiseaux pourra être inférieur à 7. Pour la procédure d'évaluation des moyens de contrôle, l'effectif a été calculé sur la base d'essais antérieurs pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en permettant de tester un nombre élevé de produits à chaque expérimentation. De plus, pour cette dernière procédure, tous les animaux élevés et non sélectionnés pour l'inclusion dans le dispositif expérimental seront dès que possible utilisés dans les procédures de multiplication et d'évaluation du pouvoir pathogène afin d'en limiter le nombre.

Les procédures ne devraient être à l'origine d'aucune souffrance. Les doses d'oocystes permettront de reproduire un épisode de coccidiose avec des signes cliniques transitoires, ne dépassant pas les limites de tolérance établies, sans quoi une euthanasie compassionnelle sera réalisée.

De nouvelles cages installées en 2017 permettent un meilleur raffinement dans l'hébergement, tel que la mise en place de perchoirs et de mobiles dans les cages, en plus d'un éclairage naturel respectant le rythme circadien des oiseaux.

10871 En pharmacologie, la libération prolongée désigne la propriété d'une forme pharmaceutique de délivrer un principe actif de façon contrôlée dans le temps, avec le but de maintenir dans l'organisme des niveaux actifs de médicament pendant une longue période. Cette action peut être obtenue par divers moyens : un implant solide ou liquide qui est chargé avec le principe actif et va le délivrer lentement après son injection, la stabilisation du médicament greffé avec des molécules de synthèse lui permettant de circuler plus longtemps dans le sang ou encore d'être activé de façon différée et contrôlée par une source externe, etc.

La législation impose de démontrer la sécurité et l'efficacité de ces produits, notamment sur des organismes vivants, pour qu'ils puissent obtenir une autorisation de mise sur le marché.

Ce projet a pour objectif d'évaluer la tolérance et la libération de différents types d'implants et formulations à libération prolongée chez le lapin. La tolérance sera étudiée par un suivi vétérinaire quotidien de l'animal ainsi que par l'analyse de prélèvements biologiques sanguins ou tissulaires. L'étude de la libération se fera par le dosage de la molécule dans le sang et/ou l'organe cible à plusieurs délais après injection.

Les produits pourront être administrés à différents sites, par exemple en sous-cutanée, intramusculaire, intra-oculaire ou intra-articulaire, selon leur forme et leur conditions finales d'utilisations.

Les résultats de ces études seront utilisés soit pour apporter une preuve de concept dans les étapes préliminaires du développement des produits soit pour la constitution d'un dossier réglementaire.

L'espèce choisie, le lapin, est couramment utilisée pour ce type de tests. Sa taille et son anatomie permettent de réaliser les injections dans des conditions proches des conditions finales d'utilisations et de faire plusieurs injections et prélèvements par animal, ce qui diminue le nombre total d'animaux utilisés.

Le nombre maximal d'animaux que nous envisageons d'utiliser sur les 5 années de l'autorisation de projet est de 300 lapins, soit environ 60 lapins par an pour les 5 ans de la demande.

Principe des 3R :

Remplacement : l'évaluation biologique des médicaments et implants médicaux, notamment les effets locaux et systémiques, est requise par la loi. Les tests *in vitro* sur cultures cellulaires peuvent apporter des données préliminaires sur la toxicité mais ne peuvent remplacer l'évaluation sur un organisme vivant entier.

Réduction : les animaux sont utilisés comme leurs propres témoins, c'est-à-dire que l'on injecte a minima à chaque animal une formulation sans principe actif et une formulation avec principe actif. Quand l'étude le permet, on administre plusieurs formulations avec principe actif au même animal afin de réduire la variance interindividuelle et le nombre total d'animaux utilisés.

Raffinement : un protocole de suivi quotidien des animaux et de prise en charge de la douleur est utilisé afin de réduire au maximum la douleur animale. Les injections sont réalisées sous anesthésie générale avec protocole analgésique. Le milieu est enrichi par des plateformes, morceaux de bois pour que les animaux puissent jouer, ainsi que des carottes et du persil.

10872 Les perturbations flux sanguin conduisent à une dysfonction de l'endothélium qui accompagne les premières étapes du développement de l'athérosclérose (athérogenèse), une maladie affectant les vaisseaux sanguins et conduisant à des complications thrombotiques graves. La perturbation du flux sanguin, en plus de ses conséquences sur la dysfonction endothéliale, pourraient générer des lésions mécaniques significatives, provoquant ou conditionnant une réaction inflammatoire locale,

et favorisant l'athérogenèse. L'implication de ces lésions est suggérée par la présence massive de globules rouges pro-athérogènes entre l'endothélium et la paroi artérielle. Le processus permettant cette entrée n'a cependant pas encore été exploré. Des données anciennes, suggèrent l'existence généralisée de « micro-brèches » endothéliales. Ces brèches pourraient favoriser l'entrée d'éléments sanguins dans la paroi artérielle et constituer un mécanisme déterminant de l'athérogenèse. A cet égard, nous évaluerons l'impact des forces hémodynamiques sur la formation de brèches et leur rôle dans l'athérogenèse ainsi que le rôle de l'immunité innée dans la réponse biologique locale.

Nous adapterons un modèle murin de sténose carotidienne partielle (rétrécissement artériel expérimental générant une perturbation du flux sanguin), chez des souris C57bl6 et sur fond hypercholestérolémique ApoE^{-/-} (n=150). Cette sténose sera provoquée à l'aide de manchons constrictifs développés « à façon » et imprimés en 3D par stéréolithographie de haute résolution, qui permettront de tester l'effet croissant, localisé, et contrôlé dans le temps, de la perturbation du flux sanguin. Le fonds génétique des souris est contrôlé et homogène. Les souris contrôles proviennent des mêmes croisements que les souris mutées. L'inactivation de l'ApoE ne produit aucun phénotype dommageable, hormis une légère hypercholestérolémie en absence de régime spécial.

Une étude statistique pour le calcul du nombre de sujets nécessaires a été réalisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux et éviter toute souffrance inutile : calcul de la taille de l'échantillon avec le logiciel JMP pour une puissance de 80% pour les expériences de perturbation du flux sanguin et un risque alpha de 5%, en prenant en compte des données précédentes de la littérature et du laboratoire. Ces facteurs vont réduire fortement la variabilité expérimentale et donc le nombre d'animaux nécessaires.

Ce projet nécessite l'utilisation d'animaux, car il est primordial de tester les hypothèses *in vivo*, dans un contexte vasculaire physiologique parfaitement intégré. Il n'existe par ailleurs par d'alternative *in vitro* valables pour ce genre d'étude. Ce projet respecte néanmoins la règle des 3R. Afin de respecter le principe de raffinement, la douleur sera réduite pendant les procédures expérimentales (anesthésie et analgésie). Par ailleurs, les animaux seront observés tous les jours par les membres qualifiés de l'animalerie et tout comportement anormal sera directement communiqué à la personne responsable du projet. Concernant le remplacement, nous nous efforçons d'utiliser autant que possible des tests *in vitro* en culture cellulaire pour tester nos hypothèses moléculaires et cellulaires. De plus, les animaux seront observés régulièrement (au moins 1 fois par semaine) par les expérimentateurs confirmés responsables du projet connaissant bien les modèles utilisés. Enfin, les animaux sont maintenus sans isolement et avec un enrichissement environnemental approprié. Ce projet permettra de mettre en lumière de nouveaux mécanismes jusqu'alors inexplorés de l'athérogenèse.

10873 En transplantation hépatique, le principal problème est la pénurie de greffon en raison du faible pool de donneurs. Afin d'augmenter le nombre de donneurs, les greffons sont issus de donneurs de plus en plus âgés, dits "à critères élargis" et présentant des lésions de stéatose hépatique. La stéatose hépatique correspond à l'accumulation de graisses, en particulier de Triglycérides dans le cytoplasme des hépatocytes et représente un facteur de mauvais pronostic des greffons hépatiques avec une diminution de la survie du greffon et du receveur et une augmentation des dysfonctions précoces du greffon après transplantation hépatique. L'ischémie-reperfusion (IR) hépatique est une succession de phénomènes associant des lésions tissulaires liées à une interruption du flux sanguin de l'organe cible (ischémie) et à la restauration de ce flux sanguin (reperfusion ou ré-oxygénation). Le maintien d'une oxygénation tissulaire adéquate est essentiel au fonctionnement physiologique des différents organes. L'IR peut survenir dans de multiples situations cliniques comme lors de traumatismes, au cours de la chirurgie hépatique et plus particulièrement en transplantation. Il n'existe aucun traitement préventif ou curatif des lésions d'IR. Un modèle animal vivant est donc nécessaire pour étudier ces phénomènes liés à la circulation sanguine. Le modèle murin étant un modèle validé d'IR hépatique et assez simple à mettre en œuvre, nous avons donc choisi ce modèle. Le but de ce projet de recherche est d'évaluer les lésions secondaires à l'ischémie-

reperfusion sur un modèle murin stéatosique hépatique et de tester un traitement préventif (inhibiteur de tyrosine kinase).

Le projet, réalisé sur 374 souris males C57BL6J âgées de 6 à 12 semaines, sera divisé en 3 grandes phases, après la réalisation d'une étude pilote menée sur 30 souris pour la mise au point de la chirurgie d'ischémie-reperfusion hépatique. Ce nombre nécessaire d'animaux a été calculé pour permettre une étude statistique fiable (3R : Réduction). Les animaux seront hébergés par 5 dans des cages ventilées par air filtré, avec enrichissements à types de copeaux, nids et tunnels, avec alimentation et eau *ad libitum*, dans des locaux Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS) agréés par le Ministère de l'Agriculture, dont la température et l'hygrométrie sont continuellement surveillés par télémétrie. Lors des chirurgies, les animaux seront installés, sous anesthésie générale (Kétamine 100mg/kg et xylazine 10mg/kg), sur un tapis chauffant pour prévenir l'hypothermie ; une compresse humide et du gel oculaire (Ocrygel) seront appliqués sur les yeux pour protéger les cornées de l'animal. L'analgésie sera assurée par une injection de buprénorphine (0,5mg/kg) 30min avant l'incision (3R : Raffinement). Les animaux feront l'objet de visites et contrôles au minimum quotidiens par du personnel formé et qualifié, et l'absence d'atteinte de point limite sera surveillée.

La première phase (n=144 souris) concernera la caractérisation du modèle de stéatose hépatique par évaluation biologique, volumétrique (scanner) et fonctionnelle (SPECT-CT "Single Photon Emission Computed Tomography"), la deuxième phase (n=100 souris) évaluera l'impact de la stéatose hépatique sur les lésions d'ischémie-reperfusion hépatique, et la troisième phase (n=100 souris) portera sur l'essai d'un traitement (inhibiteur de kinase) sur les lésions d'ischémie-reperfusion hépatiques sur un modèle murin de stéatose hépatique.

Afin de diminuer le stress des animaux, l'hébergement se fera en groupe de 5 par cage avec enrichissement (dômes opaques pour refuges) et un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau de boisson.

10874 Ce projet a pour but de caractériser les effets induits par l'absence de la phosphatase Wip1, marqueur des cellules souches adultes, sur l'homéostasie cutanée et plus particulièrement sur les conséquences physiologiques impliquées (sensibilité cutanée). Le sens du toucher comporte de nombreux aspects, impliquant plusieurs types de récepteurs cutanés : 1) les sensations mécaniques, 2) les sensations thermiques, et 3) les sensations de douleurs (via nocicepteurs). Plusieurs types de récepteurs ont été identifiés dans la peau : i) des récepteurs mécaniques, de cinq types différents, qui transmettent la sensibilité à la pression, la sensibilité à la vibration et la sensibilité fine épicrotique ou tact ; ii) des thermorécepteurs qui transmettent la sensibilité au chaud et au froid ; iii) des nocicepteurs, qui sont des récepteurs de la douleur. Nous avons montré qu'au sein de la peau de souris *in vivo*, les cellules qui expriment Wip1 sont regroupées et semblent associées aux nerfs cutanés. Il est maintenant nécessaire d'évaluer les conséquences comportementales de cette colocalisation. Les études fonctionnelles basées sur le comportement ne peuvent être réalisées que sur animal vigile. Les modèles murins sont les modèles génétiquement modifiés les plus répandus pour étudier les épithéliums et l'homéostasie de différents organes nous permettant de comparer nos travaux avec la littérature abondante dans ce domaine. De plus, les modèles transgéniques que nous souhaitons utiliser, sont disponibles/générées chez la souris. Les mesures comportementales que nous souhaitons réaliser ne peuvent être faites *in vitro* car elles requièrent l'intégralité de l'animal. Cette approche comportementale permettra ainsi d'apporter un éclairage nouveau sur le rôle de Wip1 dans la sensibilité cutanée.

Ce projet repose donc sur la comparaison du phénotype comportemental (réponses à 3 types de stimuli : mécanique, thermique et chimique) d'animaux contrôles avec des animaux délétés pour Wip1 au cours d'une cinétique après induction de la délétion (sans différence de sexe). Afin de répondre à la règle des 3R, nous proposons :

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été choisi afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs avec le nombre de souris minimum. Une analyse statistique prévisionnelle a été réalisée par simulation Monte Carlo (logiciel Power and Precision V4) afin de

déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour chaque expérimentation. De plus, nous utiliserons mâles et femelles aussi souvent que possible.

Remplacer : De nombreuses publications ont décrits les cultures organotypiques et co-culture Kératinocytes/Fibroblastes comme une méthode de remplacement pour l'étude de la peau. Cependant, elles ne sont pas applicables dans le cas présent, car 1) elles ne récapitulent pas toute la complexité de l'organe, 2) ils sont inutilisables pour l'analyse du comportement de l'animal *in vivo*.

Raffiner : Aucune injection, ni prélèvement ne sera effectué sur l'animal dans ce projet, ce qui limitera le stress des animaux. Nous utilisons également des modèles inductibles ; ainsi que des temps d'habituation d'une heure avant les tests et de repos/récupération de 30min entre les tests. Les animaux sont vigiles et libres de leur mouvement la plus grande majorité du temps, et un suivi précis de la douleur et des points limites sont mis en œuvre. Un nombre maximal de 244 souris seront utilisés.

10875 Le circovirus porcin de type 2 (PCV2) est l'agent viral responsable de la maladie d'amaigrissement du porcelet affectant les porcelets en post-sevrage. L'infection par le PCV2 a de lourdes conséquences économiques en production porcine. Il est présent dans la majorité des élevages sans symptôme associé, et peut donc être retrouvé dans des proportions plus ou moins importantes dans le plasma des porcs adultes. Or, ce plasma est utilisé ponctuellement comme additif alimentaire, juste après le sevrage, pour apporter des anticorps qui pourraient renforcer l'immunité des porcelets. Dans ce cas, il faut s'assurer que ce plasma ne contient pas de PCV2 pouvant avoir un impact sur les animaux. Au moment du post-sevrage, le système immunitaire des porcelets est immature et ne pourra pas contrôler ce pathogène. Dans un premier temps, un processus d'hygiénisation du plasma de porc contenant du PCV2 a été développé *in vitro* en laboratoire de manière rationnelle en optimisant le pH, la température d'incubation et le temps d'incubation. Malheureusement, la sensibilité de la méthode de titration *in vitro* du PCV2 résiduel n'est pas assez forte pour garantir l'absence de risque infectieux lié au PCV2. Pour valider la méthode d'hygiénisation développée *in vitro*, nous sommes obligés de passer par un bio-essai, c'est-à-dire la méthode la plus sensible et la plus adaptée, réalisé avec des porcelets qui seront nourris avec de l'aliment supplémenté avec le plasma. Pour cela, 3 plasmas différemment chargés en PCV2 provenant de diverses sources seront hygiénisés et évalués. En parallèle, un plasma non hygiénisé sera intégré à l'essai en tant que témoin positif d'infection.

Notre procédure expérimentale sera menée dans le respect de la règle des 3R. Tout d'abord, la méthode d'hygiénisation du plasma porcin vis-à-vis du PCV2 a été optimisée *in vitro*, et seule la méthode la plus efficace *in vitro* sera évaluée *in vivo*. De plus, le nombre de porcs utilisés sera réduit au seuil de la pertinence scientifique (nombre total utilisé : 16 porcs pour pouvoir appliquer des tests statistiques robustes). Pour le raffinement, des mesures visant à assurer des conditions d'hébergement limitant l'angoisse des animaux (accès à l'eau et à la nourriture à volonté, enrichissements de l'environnement par des objets manipulables, présence de lampes chauffantes, de plaque de couchage) et à limiter la souffrance seront appliquées. Il est à noter que pas ou peu de PCV2 résiduel persiste après l'étape d'hygiénisation. De même, en ce qui concerne le groupe témoin positif (plasma non hygiénisé), la souche de PCV2 utilisée sera quasiment asymptomatique, hormis une courte période d'hyperthermie modérée. Ceci implique que, dans tous les cas, si infection il y a, elle sera sans doute de faible ampleur, mais des mesures basées sur des atteintes de points limites (réactivités des animaux à des stimuli, hyper et hypo-thermies, pertes d'appétits et/ou pertes de poids sévères) ou l'apparition de douleurs ou de blessures sont prévues pour limiter la souffrance éventuelle. Pour le remplacement, il n'est pas envisageable car il n'existe pas de méthode à base de culture cellulaire suffisamment sensible pour garantir l'absence de risque infectieux résiduel lié au PCV2 dans le plasma porcin traité par le processus d'hygiénisation.

10876 Le diabète représente la troisième cause de mortalité dans le monde et constitue donc un véritable problème de santé majeur. Les ulcères du pied sont une complication fréquente chez les patients diabétiques. En effet, 15 à 25% des patients diabétiques présenteront des ulcères du pied au cours de leur vie. L'infection de ces ulcères est une complication grave, pouvant entraîner une amputation

et parfois mettre en jeu le pronostic vital. Actuellement, les infections des ulcères du pied diabétique sont le plus souvent dues à des staphylocoques, notamment *Staphylococcus aureus* et sont traitées par antibiothérapie. Cependant, face à l'émergence des bactéries multirésistantes, l'antibiothérapie classique montre ses limites.

Dans ce contexte, il est donc aujourd'hui nécessaire de trouver des solutions alternatives et/ou complémentaires aux antibiotiques, pour traiter ces infections.

La phagothérapie (usage de bactériophages) apparaît aujourd'hui comme une solution pertinente. Les bactériophages sont des virus qui possèdent la particularité de n'infecter que les bactéries, d'être inoffensifs pour tous les organismes eucaryotes tels que les mammifères (humains, animaux) et d'être très spécifiques de l'espèce bactérienne qu'ils attaquent. Ils sont déjà largement utilisés chez l'homme sous forme de cocktails en Europe de l'Est mais, s'agissant d'organismes vivants, leur développement en France se heurte à un cadre réglementaire peu clair et inadapté à la phagothérapie dans la conduite d'essais cliniques. De ce fait, les agences réglementaires demandent la réalisation d'études pré-cliniques préalables. Le projet présenté ici s'inscrit dans la conduite d'un projet collaboratif national.

Dans ce projet, il est donc prévu :

1. De mettre au point un modèle de souris diabétique (induit chimiquement, en testant différentes molécules et différentes doses)
2. De mettre au point un modèle d'infection du pied à *Staphylococcus aureus* chez la souris diabétique ;
3. De tester l'efficacité d'un cocktail de bactériophages dans ce modèle d'infection à *Staphylococcus aureus* chez la souris diabétique.

1072 souris BalbC femelles et 40 souris C57bl6 mâles seront utilisées pour ce projet.

Dans le respect de la règle des 3R. Un gros travail a été réalisé *in vitro* sur l'efficacité du cocktail de bactériophages sur un grand nombre de souches de *S. aureus* ainsi que dans des modèles de biofilm. Toutefois, l'efficacité de tels composés *in vivo* peut s'avérer très différente de celle obtenue *in vitro* tant sur le plan de l'efficacité elle-même que sur la cinétique des phages dans un organisme vivant au niveau du site de l'infection. Enfin, les modèles pré-cliniques sont réglementaires pour le développement de ces nouvelles alternatives thérapeutiques, au vu du peu d'informations existantes sur ce sujet. Plusieurs études pilotes seront préalablement réalisées afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés au cours de ce projet. La sélection du cocktail de bactériophages le plus actif aura préalablement été réalisée *in vitro* afin de limiter le nombre d'animaux testés. Les animaux seront placés par groupe de 8 ou 10 souris et les conditions d'hébergement seront optimisées par un enrichissement du milieu. De plus, la technique d'infection sera réalisée sous une anesthésie fixe et une visite quotidienne sera réalisée par nos soins afin d'assurer au maximum le bien-être des animaux.

10877 Ce projet a pour but d'étudier l'un des mécanismes à l'origine de l'apparition des hémopathies malignes chez l'homme. Ce mécanisme potentiel précis a été identifié chez des patients, mais il reste à le confirmer (confirmation de son rôle et du mécanisme de ce rôle dans l'apparition de la maladie cancéreuse) et le caractériser précisément.

Les hémopathies malignes sont des affections de la moelle osseuse, tissu qui est responsable de la fabrication de l'ensemble des cellules du sang (globules rouges, globules blancs et plaquettes). Les hémopathies malignes regroupent un ensemble hétérogène de cancers des cellules sanguines. Parmi ceux-ci, les syndromes lymphoprolifératifs et les lymphomes sont des tumeurs du système immunitaire. Toutes les hémopathies sont la conséquence de nombreuses anomalies génétiques le plus souvent acquises. Ces mutations touchent des gènes dont les produits participent au contrôle des grands processus cellulaires, comme la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire, la régulation de la transcription, la structure de la chromatine, l'épigénétique, le métabolisme de l'ARN ou encore la signalisation intracellulaire. Ils peuvent aussi permettre un échappement à la surveillance du système immunitaire.

Les conséquences fonctionnelles de ces événements à l'origine du cancer ne peuvent être pleinement appréhendées qu'au sein d'un organisme vivant ; en effet ces anomalies génétiques fondatrices influent sur l'expression de nombreux gènes qui eux-mêmes conditionnent le devenir des cellules en réponse aux multiples signaux extra-cellulaires présents chez un individu et au sein d'un tissu (hormones, facteurs de croissance etc...). L'utilisation d'animaux est incontournable pour évaluer l'importance des processus biologiques affectés par ces anomalies fondatrices ainsi que leur interaction avec le système immunitaire. Pour ces raisons, nous établissons des lignées de souris génétiquement modifiées reproduisant les anomalies moléculaires d'intérêt et développant à terme des pathologies proches de la maladie humaine. Néanmoins, nous privilégions aussi en tout temps toute étude *in vitro* sur modèles cellulaires établis, ou sur cellules primaires de patients, nous permettant de valider nos hypothèses de travail.

Dans ce projet, nous étudierons les conséquences de l'expression d'une mutation touchant le gène SPI1 sur l'hématopoïèse et la réponse immunitaire adaptative. SPI1 code pour un facteur de transcription essentiel au développement hématopoïétique [1-3]. Nous avons identifié cette mutation ponctuelle et récurrente dans un syndrome lymphoprolifératif humain (résultats non publiés). Cette pathologie est associée à des mutations de molécules impliquées dans la signalisation intra-cellulaire (MYD88 et CXCR4), pour les plus fréquentes [4]. Les anomalies du gène SPI1 sont observées dans plusieurs type de cancer du sang [5, 6]. [7] dont des syndromes lymphoprolifératifs humains (résultats non publiés). Nous développons un modèle de souris Knock-in (KI) inductible où l'expression d'une forme mutée de SPI1 (SPI1QE) peut être exprimée de façon inductible à l'âge adulte, à partir du promoteur naturel du gène. L'induction se fait par l'expression of l'activation d'une recombinase spécifique (l'enzyme Cre). L'étude de cette lignée de souris nous renseignera sur les processus biologiques et les mécanismes moléculaires associés à la transformation tumorale des lymphocytes B. Aucune donnée n'est disponible quant à ses conséquences cellulaire et l'apparition d'un phénotype. Aucune notion non plus de pénétrance. Nous utiliserons deux lignées exprimant Cre, l'une ciblant l'activité inductible (par le Tamoxifen) de l'enzyme dans les cellules souches hématopoïétiques (Scl-CreErt), l'autre exprimant une enzyme active dans la différenciation lymphoïde de type B (CD19-Cre). Le nombre maximum de souris utilisées sera de 2920. Au cours de ce projet :

- Nous évaluerons l'impact de l'expression de cette anomalie génétique sur le développement des lignées hématopoïétiques chez l'animal jeune (avant 1 an) et chez l'animal plus âgé (>18 mois),
- Nous rechercherons les conséquences de l'expression de cette mutation sur la maturation de la réponse immunitaire,
- Nous chercherons à définir si ce contexte génétique promeut l'émergence de proliférations tumorales, et dans quels types cellulaires,
- Nous étudierons la coopération entre cette anomalie génétique précoce et d'autres anomalies génétiques connues pour être associées à cette mutation de SPI1 (MYD88 et CXCR4). Les conséquences sur l'hématopoïèse, la réaction immunitaire et la transformation seront analysées.
- Nous validerons les prédictions du rôle important de certains gènes dans les phénotypes observés. Par exemple, d'autres facteurs de transcription sont indiqués comme important dans les fonctions de Spi1, par nos analyses en cours. Les analyses seront limitées à quelques candidats.
- Nous analyserons les conséquences de l'inactivation du gène Tet2 sur la fonction de SPI1 (le gène TET2 est un suppresseur de tumeur dont le produit interagit avec SPI1) sur l'initiation et le développement de la maladie. Les souris conditionnelles Tet2 sont disponibles au laboratoire.
- Nous étudierons le caractère transformé des proliférations hématopoïétiques obtenues dans ces différents modèles expérimentaux par greffe dans des souris receveuses secondaires.

Toutes les interventions invasives seront faites sous anesthésie à l'isoflurane et un analgésique local si requis (buprénorphine, pour les injections intrafémorales). Les animaux bénéficieront d'un environnement enrichi en permanence. Du DietGel Energy sera ajouté dans les cages en cas de diminution de la prise alimentaire. Le nombre d'animaux choisi pour chaque lot représente le minimum requis pour constituer un échantillonnage représentatif. Nous limiterons le nombre d'animaux utilisés, en utilisant le plus de contrôles communs.

10878 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, c'est à dire l'occlusion d'un vaisseau cérébral par un caillot sanguin, est la 2ème cause de mortalité dans le monde, la 1ère cause de morbidité et la 2ème cause de démence des pays industrialisés : 120 000 personnes en sont victimes chaque année en France. Le rtPA ou activateur tissulaire du plasminogène et la thrombectomie, permettant de détruire le caillot sanguin ne peuvent être administrés respectivement que lors des 4.5 et 8 premières heures de survenue de l'AVC, ce qui limite considérablement leur utilisation. De plus, des phénomènes inflammatoires se mettent en place et se poursuivent pendant plusieurs semaines. Le diabète est un facteur de risque des AVC, qui sont alors plus sévères d'emblée, avec un handicap résiduel et une proportion de démence, qui complique les AVC à long terme, plus importants. Ceci est d'autant plus alarmant qu'il est prévu une pandémie d'ici 2030. La thérapie cellulaire dans l'AVC est une stratégie intéressante et bien adaptée à la lutte contre les phénomènes délétères à long terme, puisqu'elle peut être administrée bien après la phase aiguë, favorise les mécanismes endogènes de réparation cérébrale que sont l'angiogenèse et la neurogenèse et a des propriétés de modulation de l'inflammation. Les cellules mononucléées (CMN) du sang périphérique sont des cellules à un seul noyau et comprennent tous les globules blancs excepté les granulocytes, mais aussi les progéniteurs vasculaires circulants. Elles ont l'avantage d'être facilement et rapidement isolées, chez le patient diabétique et, lorsqu'elles sont stimulées par l'éphrine-B2 (CMN+) *in vitro*, et administrées par voie intraveineuse chez des souris sans facteur de risque vasculaire, elles sont capables de promouvoir ces processus de réparation et de réduire le volume de l'infarctus cérébral. Aucune étude n'a été menée chez des animaux diabétiques à notre connaissance et aucune étude n'a évalué l'impact de ces cellules sur l'altération de la mémoire et de l'apprentissage de ces animaux à long terme.

Les objectifs du projet sont 1) de valider un modèle de démence vasculaire (post-AVC) en mettant en place une batterie de tests comportementaux, 2) d'étudier les effets de l'administration des CMN et des CMN+ en terme de réduction du volume de l'infarctus cérébral et d'amélioration du déficit neurologique dans les 1ers jours ; 3) d'étudier les effets de l'administration des CMN et des CMN+ en terme d'amélioration des tests de mémoire et d'apprentissage à long terme et 4) d'en étudier les mécanismes : régulation de la réponse inflammatoire post-ischémique par ces cellules et modification du réseau neuronal sur le plan électrophysiologique.

Les différents axes du projet impliquent 466 souris pour l'ensemble des procédures expérimentales pour une période de 5 ans.

Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Après la mise à mort des animaux, le sang et les tissus (cerveau, rate, moelle osseuse et foie) qui participent à l'inflammation systémique sont prélevés et stockés pour les analyses biochimiques et histologiques. Un soin particulier sera apporté au traitement contre la douleur avant et après les procédures chirurgicales et l'animal sera surveillé jusqu'à la fin de l'étude. Une analgésie par buprénorphine (0.1mg/kg en sous-cutané) sera réalisée 30 minutes avant le début de la procédure chirurgicale et renouvelée /12h pendant 48h. La souris est surveillée en couveuse puis remise en cage (5 souris par cage). Au cas où les douleurs persisteraient malgré les procédures entreprises, l'animal sera mis à mort.

La demande de ce projet d'expérimentation animale est justifiée par le fait qu'aucune approche *in vitro* ne permet de rendre compte des processus de mémoire et d'apprentissage, ni de la complexité des interactions entre les organes lymphoïdes et le cerveau après ischémie cérébrale au cours du temps. Ce modèle d'AVC n'est pas remplaçable.

10879 Le rat-taupe nu (RTN) est un petit rongeur présent majoritairement en Afrique de l'est et qui possède plusieurs particularités remarquables :

- il vit selon un mode dit « eusocial » en colonie d'une centaine d'individus ;
- sa longévité peut dépasser 30 ans en captivité, contrairement aux autres rongeurs comme la souris qui vivent entre 3 et 4 ans, et n'est donc pas exposé au même risque potentiel de mortalité en vieillissant, contrairement aux autres mammifères ;

- il est capable de réorganiser son métabolisme pour le rendre tolérant à un environnement faible en oxygène ;
- il est résistant à plusieurs pathologies comme les maladies cardio-vasculaires, la dégénérescence nerveuse mais surtout plusieurs formes de cancers.

Les cellules et les tissus des RTN produisent une grande quantité d'acide hyaluronique de haut poids moléculaire (High Molecular Mass Hyaluronan ou HMM- HA). En effet, la masse moléculaire de l'acide hyaluronique présent chez le RTN serait cinq fois supérieure à celle de l'Homme ou de la souris. Cette grande quantité d'HMM- HA rendrait sa peau plus élastique et épaisse et lui éviterait la survenue de plaies. L'HMM-HA interagit avec le récepteur CD44 et déclenche un contact d'inhibition précoce dans les fibroblastes (via l'activation de p16INK4a ou de pALT). Ce contact d'inhibition précoce provoque alors un arrêt du cycle cellulaire et prévient l'hyperplasie, protégeant ainsi ces animaux contre le cancer. De plus, cet HMM-HA empêcherait le risque de formation de métastases en maintenant une matrice extracellulaire plus solide et agirait comme anti-oxydant. Les cellules du RTN semblent également posséder un épigénome plus stable que celui des cellules de souris, évitant les processus de reprogrammation cellulaire et contribuant ainsi à la résistance tumorale. Enfin, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs comme p53, RB or p19ARF dans les cellules du RTN provoque rapidement l'entrée de ces dernières en sénescence ou en apoptose, alors que l'inactivation d'une de ces molécules chez la souris entraîne à l'inverse une prolifération cellulaire rapide. Il est à noter que le génome du RTN a été séquencé en 2011.

Dans le présent projet nous allons mener deux types d'études :

1) la collecte d'échantillons cutanés de quelques millimètres sur le dos de RTN et l'étude des caractéristiques du tissu cutané prélevé sur le plan de son anatomie, du pourcentage de cellules prolifératives et quiescentes ainsi que la mise en culture des différents types cellulaires présents. Ces échantillons seront comparés à des échantillons issus d'autres espèces de mammifères glabres (souris nude ou cochon d'inde nu). Les caractéristiques du processus de cicatrisation chez le RTN seront également étudiées dans les semaines suivant ces prélèvements.

2) une partie des échantillons prélevés sur le RTN sera greffée sur des souris nude (qui acceptent plus aisément les xénogreffes en raison de leur immunodéfiance). Ces souris seront exposées à des ultraviolets à des doses carcinogènes et la réaction proliférative des greffons sera comparée à celle de la peau de la souris receveuse.

Dans ce projet nous prévoyons d'utiliser au maximum 30 animaux (10 RTN, 10 souris nude et éventuellement 10 cochons d'inde nus dans le cas où la comparaison des tissus des souris et des RTN nous semblerait non satisfaisante). En dehors des souris, aucun de ces animaux ne devrait être mis à mort pour cette étude.

La collecte de tissus frais et la greffe de peau ne peuvent être remplacées par des techniques n'utilisant pas d'animaux. Les groupes d'animaux sont constitués de 5 animaux (il y en a 10 par espèce car à ce stade nous souhaitons étudier les différences entre les juvéniles et les animaux matures) et ce nombre ne peut pas être réduit afin d'à la fois décrire les différences entre groupes et la variabilité au sein de ceux-ci. Les traitements pratiqués sur ces animaux demeurent relativement bénins (biopsie cutanée de petite taille) et ne devraient pas empêcher les sujets ainsi traités de continuer leur vie au sein de la colonie. Le cas des souris est différent car elles recevront un traitement connu pour être carcinogène. Elles feront l'objet d'une surveillance rapprochée et dans le cas où l'irradiation ou la greffe aurait un impact négatif et important sur l'animal, l'essai serait stoppé.

10880 Le projet de l'équipe est de comprendre les mécanismes physiopathologiques des déficiences intellectuelles d'origine génétique.

Remplacement :

Nous utilisons la souris en tant que modèle de ces syndromes comme espèce pouvant être manipulée génétiquement et ainsi modéliser ces pathologies. De plus, les anomalies à observer (déficits cognitifs) nécessitent un modèle vivant suffisamment proche de l'homme pour avoir des

tests comportementaux qui peuvent être transposés à celui-ci. Le modèle souris est donc la meilleure option ici.

Dans ce projet, nous nous intéressons à la perte de fonction d'un gène qui entraîne un syndrome de retard mental associé à une diminution de la taille du cerveau, de l'épilepsie et des comportements autistiques.

Les souris mutantes pour ce gène présentent une microcéphalie, une sensibilité aux crises épileptiques induites et un déficit de sociabilité, récapitulant certains des traits observés chez les personnes. Cependant, une analyse plus approfondie des phénotypes cognitifs associés au retard mental et au comportement autistique n'a pas encore été réalisée.

Une série de tests de comportement portant sur les symptômes observés dans le syndrome (hyperactivité, mémoire, traitement de l'information sensorielle et comportement de type autistique) peu voire non-invasifs sera réalisée, le premier test commençant vers l'âge de 12-13 semaines.

Raffinement :

L'ensemble des tests comportementaux n'entraîne pas de stress ou souffrance sévère pour l'animal et les animaux feront l'objet d'un suivi permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé. Les animaux présentant des signes de douleur seront euthanasiés car inaptes à une étude comportementale. Les animaux seront euthanasiés après la dernière procédure expérimentale.

Réduction :

Entre 12 et 16 individus mutants et 12 et 16 individus contrôles (32 souris) sont requis pour obtenir une puissance statistique suffisante afin de conclure à un phénotype ou non. Une deuxième cohorte d'animaux est requise afin de répéter les tests dans lesquels un phénotype a été vu afin de valider ce phénotype. La totalité de ces expériences nécessitera donc l'utilisation 64 animaux au maximum.

10881 La neurofibromatose de type 1 (NF1) est une maladie génétique autosomique fréquente (1/3000) liée à la mutation du gène NF1. Tous les patients NF1 développent des tumeurs des gaines nerveuses appelés neurofibromes (NFs). Malgré leur aspect bénin, certains NFs peuvent évoluer vers des tumeurs malignes des gaines nerveuses périphériques de mauvais pronostic. En plus des NFs présents chez tous les patients NF1, une partie d'entre eux vont développer d'autres pathologies tel des lésions osseuses ou des troubles cognitifs (apprentissage, orientation spatiale et mnésiques). Malgré des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes responsables du développement des NFs, l'origine cellulaire et les bases moléculaires responsables des troubles de comportement, qui affectent plus de 70% d'enfants NF1, restent largement incompris.

Notre laboratoire a récemment développé un nouveau modèle murin de NF1 qui récapitule fidèlement le développement des NFs et des lésions osseuses. En analysant le cerveau de ces souris, nous avons aussi observé des défauts sévères du développement de l'hippocampe et du corps calleux. Des altérations dans ces deux structures ont été également observées chez des patients NF1 et pourraient être à la base des troubles du comportement. L'objectif de ce projet est de réaliser l'analyse du comportement des souris NF1-KO afin d'établir à quel point notre modèle animal récapitule la pathologie cérébrale humaine, puis de corrélérer ces résultats avec l'analyse cellulaire et moléculaire de ces deux régions, qui est en cours dans notre équipe. L'analyse du comportement sera réalisée par une plateforme spécialisée.

Afin d'appréhender l'aspect cognitif de la neurofibromatose de type 1, il est nécessaire de disposer d'animaux modèle car il n'existe pas de méthode alternative, A ce jour, seuls ce modèle murin de la maladie permet de mimer suffisamment fidèlement la pathologie et donc d'être utilisés dans des études comportementales

La réalisation de tests du comportement est la seule façon d'évaluer l'impact fonctionnel des anomalies histologiques constatées chez nos souris NF1-KO. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous avons opté pour la taille minimale de groupes (12 souris mâles contrôles et 12 mutants = 24 souris au total dans ce projet) permettant d'avoir une puissance statistique suffisante pour les 3 tests de comportement (labyrinthe Y, test du nouvel objet, piscine de Morris) que nous réaliserons.

Ces trois tests sont nécessaires afin d'évaluer l'apprentissage, l'orientation spatiale et la mémoire de travail spatiale et non-spatiale des souris. De plus, à l'issue de cette étude les animaux seront tous euthanasiés pour réaliser l'analyse histologique des cerveaux. Enfin, nous prendrons toutes les précautions pour contrôler et réduire le stress des animaux pendant les différents tests comportementaux.

10882 Les neuropathies périphériques chimio-induites (CIPN) sont un véritable problème en oncologie. En effet, un certains nombres d'anticancéreux sont neurotoxiques comme par exemple : les alcaloïdes de la pervenche (vincristine), les taxanes (docétaxel et paclitaxel), les sels de platine (cisplatine, oxaliplatine), le bortézomib ou la thalidomide. En fonction de l'anticancéreux et des doses cumulées reçues par les patients, ces CIPN peuvent affecter jusqu'à 90% des patients, comme avec l'oxaliplatine (anticancéreux de référence dans le cancer colorectal). Ces neuropathies sont associées à des paresthésies (fourmillement), des dysesthésies (hypersensibilités tactiles ou thermiques douloureuses) et à des douleurs spontanées affectant principalement les extrémités des membres (distribution en gants et chaussettes). Or à ce jour, aucun traitement n'a démontré une efficacité univoque et les oncologues sont alors contraints de diminuer les posologies d'anticancéreux voire d'arrêter les traitements anticancéreux, au risque d'induire des neuropathies responsables de fortes comorbidités (dépression, troubles du sommeil, baisse de la qualité de vie) chez des patients déjà atteints d'un cancer ou en rémission d'un cancer.

Des travaux récents ont démontré que le donépézil permettait d'améliorer les douleurs sur un modèle animal de neuropathie induite par l'oxaliplatine. Comme le donépézil bénéficie déjà d'une indication en clinique pour le traitement de la maladie d'Alzheimer sa validation en clinique dans le traitement des CIPN sera donc facile. Cependant, avant de pouvoir étendre l'utilisation du donépézil à toutes les CIPN induites par les différents médicaments anticancéreux, il sera nécessaire d'assurer la validation préclinique de l'efficacité du donépézil sur différents modèles animaux de CIPN.

L'objectif de ces travaux consistera à explorer l'efficacité curative et préventive du donépézil sur différents modèles animaux (rats males Sprague Dawley) de CIPN induites par l'oxaliplatine, le paclitaxel, la vincristine et le bortézomib

Pour l'ensemble des expérimentations envisagées, la règle des 3R sera appliquée afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (nombre maximal d'animaux utilisé n=12 et possibilité de réduire le nombre lors d'analyse intermédiaire, nombre total et maximal d'animaux pour l'ensemble de l'étude : 612 rats), d'avoir recours à des tests validés dans la littérature scientifique et de limiter la souffrance animale (même si l'objet de ces travaux est la neuropathie périphérique souvent associé à de la douleur neuropathique, les choix des doses d'anticancéreux ont été validé dans la littérature scientifique afin d'avoir des animaux dans un bon état général indispensable pour la qualité et l'exploitabilité des résultats).

Le recours à l'animal demeure indispensable pour reproduire la complexité des symptômes présenté par les patients en clinique, c'est-à-dire l'administration systémique d'un agent anticancéreux, un métabolisme et une symptomatologie clinique avec des anomalies comportementales non accessibles par des tests *in vitro*, *ex vivo* ou *in silico*.

Les animaux seront suivis quotidiennement (week end compris) afin de détecter tout comportement douloureux anormal. Le développement des modèles de CIPN impose des injections régulières (à minima 2 fois par semaines) avec une pesée des animaux (dose ajustée au poids) permettant un suivi rapproché de l'animal (pelage, souillure et contrôle des points limites). De plus, le lendemain de chaque injection, un contrôle de l'état des animaux est réalisé. Ce suivi est réalisé classiquement avec ce type de modèle animal de CIPN. Comme l'objectif de l'étude est l'évaluation des troubles neuropathiques, il ne sera pas envisageable de prendre en charge les douleurs par un traitement antalgique conventionnel. Il n'est aussi pas possible d'enrichir l'environnement des animaux car cela interfère avec la symptomatologie et le comportement animal (réduction de l'anxiété, modulation différentielle des troubles nociceptifs). Cet enrichissement environnemental pourrait

induire des différences de réponses du modèle animal par rapport à la littérature et lui-même être responsable d'une consommation d'animaux.

Si un animal manifeste des troubles comportementaux en lien avec une douleur excessive (prostration, vocalisation, isolement dans la cage, pelage souillé, hérissément du poil), il sera alors euthanasié par inhalation de CO₂. Ces modèles sont suffisamment évolués (raffinement du choix des doses d'anticancéreux), de telle sorte que ce genre de comportement ne se rencontre que très rarement. Aussi, les tests comportementaux permettant d'évaluer les troubles neuropathiques chez les animaux nécessitent d'avoir des animaux dans un bon état général.

Les animaux seront stabulés dans des conditions standards d'au maximum 4 animaux par cage (480 x 375 x 210 mm et surface de 1500 cm²), dans une salle climatisée (température 22+/-2°C et hygrométrie 50+/-10%) avec un cycle 12 : 12 et auront un libre accès à la boisson et à la nourriture tout au long des expérimentations.

10883 La stéatose hépatique, caractérisée par l'accumulation de graisses dans le foie est un problème de santé public majeur, son incidence a explosé, en lien avec l'épidémie d'obésité touchant les pays occidentaux. Cette maladie évolue dans un premier temps vers une inflammation chronique du foie puis vers la cirrhose hépatique et parfois le cancer et ceci en l'absence de consommation excessive d'alcool. Ce spectre de pathologies est résumé par le terme stéatohépatite non alcoolique ou NAFLD. Cette pathologie est en passe de devenir la première cause de transplantation hépatique aux USA. Aujourd'hui en France l'obésité touche 15% de la population. La seule méthode efficace induisant une perte de poids rapide et maintenue sur le long terme est la chirurgie bariatrique. Ces chirurgies sont des opérations induisant une réduction de la taille de l'estomac accompagnée ou pas d'une dérivation d'une partie du tube digestif. Ces procédures sont très efficaces non seulement sur la perte de poids et mais aussi sur l'amélioration des pathologies associées à l'obésité comme le diabète et la stéatose hépatique. Pourtant il a aussi été montré que chez certains patients, au contraire, le foie va se dégrader après la chirurgie. Les mécanismes sous-jacents à l'efficacité des chirurgies sont encore mal connus. Elles se font sur des sujets fragiles et sont souvent irréversibles. Elles peuvent induire des carences nutritionnelles et aujourd'hui encore des patients décèdent au cours de l'opération. Il est donc essentiel de comprendre comment ces chirurgies fonctionnent afin de développer des alternatives thérapeutiques moins invasives en particulier pour soigner le diabète et la stéatose.

Notre projet vise à déterminer si la stéatose hépatique de souris rendues obèses par un régime s'améliore ou s'aggrave après chirurgie bariatrique de type Sleeve Gastrectomie (SG) et de comparer les effets de la chirurgie aux effets d'une perte de poids induite par une restriction alimentaire.

Les animaux utilisés seront des souris mâles adultes de type C57BL/6 et ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 130 souris au maximum. Ceci se déroulera en plusieurs séries de 30 souris. Une série nécessite l'induction d'une obésité induite par un régime hypercalorique sur une durée minimale de 3 mois, la conduite de chirurgie et des soins post opératoires sur 1 mois. Les animaux sont alors euthanasiés pour prélever le foie et l'étudier au niveau moléculaire, ce qui prendra au moins 2 mois. Une durée de 3, 5 ans est donc nécessaire pour une conduite sereine du projet.

Remplacement : Notre projet correspond à un travail de physiologie intégrée qui permettra de comprendre les communications inter-organes et les régulations métaboliques entre l'intestin et le foie. Quelques modèles cellulaires, en particulier les organoïdes, peuvent permettre d'étudier les communications entre différents types de cellules au sein d'un organe mais aucun modèle aujourd'hui ne permet de reproduire les interactions inter-organes. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* ou *ex vivo* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires entrant en jeu.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables et valorisables ou publiables. Un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

Chaque procédure de mise au point du modèle devra être validée avant d'entamer la suivante. Si une procédure n'est pas validée le projet sera arrêté.

Raffinement : l'ensemble des procédures de ce projet vise à concilier une interprétation fiable des résultats et le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale et la prise en charge de la douleur est prévue avant, pendant et après l'opération. Nous avons inclus dans les procédures des grilles d'observations des animaux avec des scores pouvant entraîner l'euthanasie de l'animal ainsi que des grilles de suivi de poids et de prise alimentaire journalières après la chirurgie. Chez l'homme comme dans d'autres modèles animaux, la chirurgie bariatrique entraîne une restriction de la prise alimentaire et une perte de poids. Cependant une absence totale de prise alimentaire pendant plus de 48h, une perte de poids supérieure à 20% en 24h, ou une perte de poids total supérieure à 35% (du poids préopératoire) seront considérées comme des points limites entraînant l'euthanasie de l'animal.

Enfin, l'euthanasie des animaux sera réalisé un mois après la chirurgie sur des animaux préalablement anesthésiés. Du sang et le foie seront prélevés et analysés en détails pour caractériser l'état de stéatose

10884 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, c'est à dire l'occlusion d'un vaisseau cérébral par un caillot sanguin, est la 3ème cause de mortalité et la 1ère cause de morbidité des pays industrialisés : 120 000 personnes en sont victimes chaque année en France, dont les 3/4 ont plus de 65 ans. Les seuls traitements disponibles à l'heure actuelle sont : le rtPA, ou activateur tissulaire recombinant du plasminogène, qui permet de détruire le caillot sanguin qui obstrue l'artère et la thrombectomie, qui permet de retirer le caillot mécaniquement à l'aide d'un stent. Malheureusement, ces traitements ne sont possibles que lors des 4.5 à 6 premières heures de survenue de l'AVC ce qui limite considérablement leurs utilisations. Il est donc essentiel de développer de nouveaux traitements et pour cela il est nécessaire de se rapprocher de la pathologie humaine en intégrant dans nos études expérimentales les facteurs de risque des AVC. Le diabète est un important facteur de risque vasculaire car il double le risque de survenue des AVC et leur mortalité. De manière alarmante, il est prévu une pandémie de diabète d'ici 2035, et donc de la survenue d'AVC, et la recherche de traitements efficaces est d'autant plus cruciale. L'AVC est responsable d'une cascade d'événements, qui vont eux-mêmes aggraver la lésion cérébrale. Ainsi, le rôle délétère de l'inflammation dans le cerveau est bien connu, en passant par l'activation des cellules microgliales, cellules immunitaires spécifiques du cerveau. Il existe de manière paradoxale une dépression immunitaire en dehors du cerveau qui aurait un rôle dans l'aggravation des lésions. L'acétate de glatiramère (Copaxone) est un médicament employé dans la sclérose en plaques pour son rôle anti-inflammatoire et neuroprotecteur. Ce médicament, ayant déjà obtenu l'AMM chez l'Homme dans la sclérose en plaques, pourrait constituer un traitement novateur dans l'ischémie cérébrale pour contrer cette réponse inflammatoire qui, par la cascade d'événements qu'elle génère, est très délétère et contribue à l'aggravation secondaire des lésions.

Ainsi, dans cette étude nous utiliserons un modèle d'ischémie cérébrale chez des souris diabétiques, traitées ou non par l'acétate de glatiramère.

Les objectifs du projet sont d'étudier l'effet de l'acétate de glatiramère administré chez la souris diabétique, en termes de réduction du volume de l'infarctus cérébral, d'augmentation de la survie neuronale, de la neurogenèse, d'amélioration du déficit neurologique et du déclin cognitif. Nous analyserons dans un second temps les mécanismes impliqués et en particulier la régulation de la réponse inflammatoire post-ischémique par ce traitement chez ces souris diabétiques.

Les différents axes du projet impliquent 304 souris pour l'ensemble des protocoles expérimentaux pour une période de 5 ans. Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Une analgésie par buprénorphine (0.1mg/kg en sous-cutané) sera réalisée 30 minutes avant le début de la procédure chirurgicale et renouvelée /12h pendant 48h.

Après la mise à mort des animaux, le sang et les tissus (cerveau, rate, moelle osseuse) sont prélevés et stockés pour les analyses cellulaires (typage des cellules), biochimiques et histologiques.

La demande de ce projet d'expérimentation animale est justifiée par le fait qu'aucune approche *in vitro* ne permet de rendre compte de la complexité des interactions entre les organes lymphoïdes et le cerveau après ischémie cérébrale au cours du temps. Ce modèle d'AVC n'est pas remplaçable.

Les mécanismes concourant à l'aggravation ou à l'amélioration spontanée des lésions cérébrales après l'ischémie cérébrale sont très mal connus. L'inflammation est un axe de recherche majeur et fait intervenir l'immunité innée et acquise, mobilisant ainsi les cellules immunitaires propres du cerveau (microglie) mais également les cellules mobilisées des organes lymphoïdes (moelle osseuse, rate) et du sang ; l'exploration intégrée de ces mécanismes

nécessitent une approche expérimentale *in vivo*, impossible à appréhender *in vitro*.

10885 Contexte : Avec 8.8 millions de décès en 2015 (OMS 2017) le cancer est la 2^e cause de mortalité dans le monde. Si les cancers de l'enfant sont rares, représentant 0,5% à 4,6% de l'ensemble des cas de cancers (OMS 2015), ils présentent des caractéristiques propres les distinguant des cancers de l'adulte, comme leurs types, leurs localisations, leurs étiologies et leur biologie. Ils nécessitent des traitements spécifiques qui tiennent compte à la fois de la toxicité des médicaments anti-cancéreux chez l'enfant en pleine croissance et de la biologie propre aux cancers pédiatriques. Les traitements doivent donc prendre en compte ces particularités dès l'évaluation préclinique afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique et de s'adapter à la physiologie de l'enfant qui sera concerné par ces traitements lors des protocoles thérapeutiques de phases I et II.

Notre projet s'intéresse aux tumeurs gliales pédiatriques de haut grade du système nerveux central. Ces tumeurs gliales (gliomes de haut grade), de très mauvais pronostic, n'ont pour l'instant aucune thérapie curative et conduisent à la mort du patient dans les 10 à 24 mois qui suivent le diagnostic. L'objectif principal de notre projet est de développer des modèles murins de ces tumeurs afin de mieux comprendre le développement tumoral et d'étudier l'efficacité de différents traitements anti-tumoraux en fonction du phénotype tumoral.

Pour cela nous utiliserons des lignées cellulaires primaires issues de tumeurs de type gliomes de haut grade provenant de patients pédiatriques ou, pour élément de comparaison, de patients adultes. Ces lignées seront greffées dans un premier temps de façon sous cutanée (xénogreffes hétérotopiques) chez des souris immunodéficientes. Les souris ainsi greffées seront traitées avec le Témazolomide (TMZ), anti-tumoral de référence utilisé en clinique humaine, ou avec un nouvel agent anti-tumoral donné seul ou en combinaison avec le TMZ. Nous testerons 3 nouveaux agents anti-tumoraux administrés seuls ou en association avec le TMZ, soit 7 traitements auxquels s'ajoutent 4 traitements contrôles. Nous évaluerons les réponses aux traitements anti-tumoraux de 10 lignées tumorales établies au laboratoire. Seules seront greffées aux souris les lignées cellulaires pour lesquelles nous aurons vérifié l'homologie de phénotype avec les tumeurs d'origine et sur lesquelles nous aurons préalablement observé *in vitro* l'efficacité des nouveaux traitements anti-tumoraux.

Si un traitement s'avère efficace sur une des lignées greffées en conditions hétérotopiques, son efficacité sera vérifiée dans un second temps en réalisant les greffes directement dans le système nerveux central (greffes orthotopiques striatales) chez les souris immunodéficientes.

A l'issue des traitements, quel que soit le type de greffe, les tumeurs seront caractérisées par des techniques d'histologie et d'analyses biochimiques (phénotypage).

Notre projet utilisera un total de 2452 souris au maximum et a été établi de façon à mettre en œuvre la règle des 3 R.

Remplacer :

Le projet utilise des lignées de cellules tumorales issues de biopsies de patients pédiatriques et adultes sur lesquelles nous aurons testé *in vitro* l'efficacité des traitements anti-tumoraux de notre projet. Cependant, même si un traitement s'avère efficace *in vitro*, il existe très fréquemment des

variations entre le comportement des cellules *in vitro* et *in vivo*. En effet, il est admis que le micro-environnement de la tumeur par exemple, joue un rôle prépondérant dans son développement et sa réponse aux traitements. La physiologie complexe du modèle animal est ainsi nécessaire à notre projet pour valider une nouvelle stratégie thérapeutique potentiellement applicable en clinique.

Réduire :

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum tout en conservant une puissance suffisante permettant une analyse statistique robuste des résultats.

Raffiner :

Des conditions stériles seront employées pendant toute la préparation du matériel à greffer et lors des greffes, réalisées sous anesthésie générale. Les conditions d'hébergement seront adaptées à l'état des animaux (nombre de souris par cage, coton compressé pour la constitution des nids, enrichissement, eau et nourriture *ad libitum*) et les soins nécessaires seront apportés. Une fois traités, les animaux retourneront dans leur cage d'origine avec leurs congénères afin de conserver leur environnement social. Une fois greffés, et jusqu'à l'arrêt du projet, les animaux seront observés quotidiennement et pesés 2 fois par semaine par un expérimentateur. Dès l'observation d'un comportement anormal d'un animal, nous mettrons en place une surveillance spécifique impliquant l'utilisation d'une grille de scores. Cette grille permettra d'évaluer la souffrance de l'animal et de déterminer si le point limite de l'étude est atteint.

Le suivi des tumeurs sous-cutanées sera réalisé de façon indolore au moyen d'un pied à coulisse, celui des tumeurs intra-cérébrales par une IRM qui sera réalisée sous anesthésie gazeuse.

En matière de retombées cliniques, ce travail qui vise à développer des modèles animaux reproductibles et originaux qui miment les tumeurs pédiatriques de gliomes de haut grade, permettrait de proposer aux enfants atteints de ces tumeurs incurables de nouvelles stratégies thérapeutiques personnalisées.

10886 Les lymphocytes T CD4 ont pour fonction d'orchestrer la réponse du système immunitaire adaptatif. Ces cellules, en plus de diriger l'orientation de la réponse immunitaire dans le but d'éradiquer les agents pathogènes, ont un rôle majeur dans le maintien de la tolérance immunitaire par le biais d'une de leur sous population, les lymphocytes T CD4 régulateurs. Dans le contexte tumoral, la génération et/ou le recrutement de cellules immuno-suppressives fait partie des mécanismes majeurs utilisés par les tumeurs afin d'échapper aux réponses anti-tumorales du système immunitaire. Parmi les cellules capables d'inhiber les réponses anti-tumorales, les lymphocytes T CD4 régulateurs tiennent un rôle de premier ordre dans le contexte tumoral. Deux origines ont été décrites pour ces cellules : Les lymphocytes T CD4 régulateurs peuvent être générés dans le thymus, ils sont alors appelés thymiques, et maintiennent la tolérance aux antigènes du soi, mais sont aussi issues de la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en lymphocytes T régulateurs dans les organes périphériques qui permettent la tolérance aux antigènes extérieurs (alimentation, bactéries commensales ou encore tolérance fœto-maternelle). Dans le contexte tumoral, la contribution de chacune de ces populations de lymphocytes T régulateurs n'a pas été établie et ce projet vise à la déterminer.

L'utilisation de l'expérimentation animale pour ce projet provient de la complexité inhérente à la biologie des tumeurs qui ne peut pas être récapitulée par des expériences *in vitro*.

Ce projet implique deux procédures : Dans un premier temps, les souris seront injectées avec des lymphocytes T CD4 naïfs par voie intraveineuse puis transplantées par voie sous-cutanée avec des cellules tumorales afin de générer une tumeur.

En conformité avec les exigences 3R :

- Des expériences préliminaires seront réalisées *in vitro* pour évaluer nos hypothèses (remplacement).
- Des lots d'un nombre réduit d'animaux seront utilisés en anticipant la validité statistique des données obtenues (réduction).

- Des expériences préliminaires réalisées sur des nombres réduits d'animaux seront mises en œuvre de façon à affiner les protocoles utilisés par la suite.
- Des mesures visant à réduire la douleur des animaux seront prises. Toutes les injections se feront ainsi sous anesthésie générale et un suivi attentif des animaux est prévu pour chaque procédure.
- Des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Le nombre total d'animaux est estimé à 400 souris pour l'ensemble du projet durant 5 ans. Les résultats obtenus dans le modèle animal devraient apporter une meilleure compréhension de la contribution des lymphocytes T CD4 régulateurs à l'inhibition de la réponse anti-tumorale et nous permettre d'envisager le développement de stratégies les ciblant.

10887 Un ensemble de données récentes suggèrent une implication conjointe des cellules gliales résidentes du système nerveux central et du système immunitaire adaptatif, plus particulièrement des lymphocytes T, dans la physiopathologie de diverses maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Néanmoins, la nature et le rôle exact des cellules T impliquées restent très mal définis, ainsi que leurs interactions avec les cellules gliales résidentes du système nerveux central. Les précédents travaux du laboratoire ont mis en évidence un rôle bénéfique d'une population particulière des cellules T, les lymphocytes T régulateurs, qui semblent moduler l'activité des cellules gliales résidentes du système nerveux central. Néanmoins, les bases mécanistiques de leurs effets restent très mal définies.

L'objectif de ce projet est de mieux caractériser le rôle de ces lymphocytes T régulateurs dans le développement de la maladie d'Alzheimer. La stratégie expérimentale est basée sur l'utilisation d'une lignée de souris transgéniques modélisant la maladie d'Alzheimer, ainsi que d'une autre lignée permettant d'éliminer sélectivement ces lymphocytes T régulateurs.

L'ensemble du projet consistera à caractériser l'impact, sur différents aspects de la physiopathologie de la maladie, de la déplétion ou l'amplification sélective des lymphocytes T régulateurs. A terme, l'ensemble de ces études devrait permettre de mieux comprendre des aspects émergents de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, et ouvrir de nouvelles pistes dans le développement de stratégies innovantes d'immunothérapie pour le traitement de cette maladie neurodégénérative.

Type d'animaux : Souris commerciales « sauvages » C57BL/6j et souris génétiquement modifiées pour les différents gènes d'intérêts.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 2608 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre les objectifs fixés en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant intégré est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de la maladie d'Alzheimer. A l'heure actuelle il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu dans les pathologies liées au vieillissement.

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

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress (anesthésie, analgésie, etc.). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le milieu est enrichi à l'aide

de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (point limite) et des soins adaptés.

10888 Les parodontites sont des maladies inflammatoires chroniques avec une perturbation de la flore buccale (dysbiose) caractérisées par une destruction des tissus de soutien de la dent (parodonte profond) entraînant à terme la mobilité et la perte des dents, et initiant ou aggravant des désordres systémiques. Les thérapies régénératives conventionnelles des parodontites s'avèrent décevantes et peu prévisibles car elles sont dirigées vers la réparation des tissus perdus sans prise en compte préalable et adéquate de l'étiophysio-pathologie de la maladie et notamment de l'inflammation. En effet, dans le but de restaurer et maintenir à long-terme l'architecture et la fonction du parodonte, il est crucial que le recrutement des progéniteurs endogènes à l'origine de la régénération tissulaire soit corrélé au rétablissement d'une flore saine associée à un contrôle de la réponse de l'hôte. Grâce aux propriétés des cellules « souches » mésenchymateuses (CSM), la thérapie cellulaire est une stratégie prometteuse dans la prise en charge des parodontites. Parmi les CSM, les cellules stromales du tissu adipeux (ASC) pourraient s'avérer de bonnes candidates en thérapie cellulaire des parodontites, étant données leur disponibilité et le peu de morbidité lié à leur prélèvement. Toutefois, les études sur la greffe d'ASC en régénération parodontale ont été réalisées sur des modèles peu pertinents, aux lésions générées mécaniquement. Aussi, les événements biologiques qui y sont associés ainsi que les procédures opératoires restent encore à définir sur des modèles plus adaptés.

Le projet a donc pour but de démontrer l'efficacité et l'innocuité de la thérapie cellulaire des parodontites par ASC et d'en décrypter les mécanismes. L'étape la plus importante est l'essai de greffe d'ASC dans un modèle de parodontite spontanée du chien, chez lequel seront mises en évidence la régénération du parodonte profond. Ce modèle animal spontané sera utilisé pour la première fois dans cette application et permettra de définir également les étapes de la procédure opératoire à visée translationnelle (pour l'homme), avec la conception d'un nouveau matériau porteur des cellules, un coagulat plaquettaire formulé pour potentialiser les fonctionnalités in situ des ASC. Les greffes d'ASC seront effectuées chez des chiens Beagle âgés de plus de 8 ans atteints de parodontites. Vingt et un sujets présentant une parodontite généralisée, modérée à sévère, seront utilisés. La période d'étude pour chaque animal s'étend sur 22 semaines.

Les chiens seront traités pour démontrer la preuve de concept (bénéfices structuraux et fonctionnels et stabilité du pronostic) grâce aux évaluations qualitatives et quantitatives à l'aide des relevés des paramètres cliniques, radiologiques et biologiques obtenus à chaque point de cinétique. Nous faisons l'hypothèse que les coagulats d'ASC, par rapport aux coagulats seuls, permettront une régénération plus complète du parodonte profond associée à la réversion de la dysbiose paromicrobienne et à une diminution importante de l'inflammation parodontale, avec un effet durable dans le temps.

La parodontite spontanée du Beagle reste le meilleur modèle intégré pouvant donner des réponses multifactorielles pour l'étude des innovations thérapeutiques dédiées à cette pathologie. Grâce à cette étude, nous aurons une réduction du nombre d'animaux utilisés, le projet pouvant être utilisé à double bénéfice, pour les 2 types de thérapies vétérinaires et humaines. Conformément au décret 2013/118, le nombre de chiens a été réduit au maximum pour pouvoir effectuer des tests statistiques avec une puissance suffisante. De plus, les animaux auront une prise en charge maximale de la douleur (anesthésie et analgésie, les procédures seront raffinées) et des soins réguliers seront apportés pour augmenter leur bien-être (couvertures chauffantes après anesthésie, brossage des dents etc.) et le suivi (suivi de poids, observations quotidiennes etc.) tout au long de leur hébergement.

En complément de cette étude chez le chien, des protocoles in-vitro (méthodes alternatives) seront orientés vers la compréhension des phénomènes biologiques impliqués dans les activités anti-infectieuses, anti-inflammatoires et de différenciation vers les phénotypes cellulaires du parodonte.

Notre projet combine donc des approches multidisciplinaires innovantes dans le but de poser les concepts clés d'une thérapie cellulaire pour traiter les parodontites.

10889 Les champs radiofréquences (RF) deviennent de plus en plus ubiquitaires. Au-delà des interrogations soulevées par le public, cela justifie de rechercher s'il existe un risque même faible, de telles expositions à faible niveau, répétées ou continues. Jusqu'à présent, seuls les effets des hautes intensités des champs RF ont été validés et attribués à des effets thermiques. Les changements dans l'adaptation à une température chaude à des champs de faible niveau et une stimulation de la thermogenèse montrée dans des travaux antérieurs suggèrent qu'une exposition chronique ou répétitive à des RF peut stimuler des processus thermorégulateurs de type « réaction au froid » : une vaso-constriction à une température ambiante de 31°C et une modification de préférence thermique protègent des pertes énergétiques, et une augmentation de température traduit une activation de la thermogenèse.

L'objectif de ce projet est d'étudier le mécanisme d'interaction du champ radiofréquence sur les effecteurs de la régulation thermique, qui induit ces adaptations chez les rongeurs. Avant et en vue d'identifier le mécanisme biophysique initial d'interaction du rayonnement radiofréquence sur une molécule ou une fonction cible, il faut rechercher les événements biologiques et biochimiques élémentaires et intermédiaires à l'origine de l'effet observé sur la température. Les effecteurs d'une réaction au froid peuvent se situer : 1) au niveau périphérique : récepteurs cutanés au froid et vasoconstriction ; 2) au niveau central : adaptation et régulation thermique par l'hypothalamus via le chiasma pré-optique ; 3) réaction au niveau périphérique : stimulation de la thermogenèse, principalement dans le tissu adipeux brun.

Le principal récepteur au froid connu chez les mammifères, commun à l'homme et aux rongeurs, est le récepteur TRPM8. Il sera donc recherché si une interaction directe avec les récepteurs thermiques TRPM8 peut être impliquée dans les effets précédemment observés. La vasoconstriction périphérique étant un effet systémique global, cet effet ne peut pas être observé par des méthodes *in vitro*, et il n'existe pas de modèle tissulaire partiel qui éviterait de rechercher cet effet *in vivo*.

Ce projet sera réalisé sur, au maximum, 186 rats Wistar mâles. Les animaux seront exposés aux RF avec un signal en émission continue à 900 MHz, à un niveau de champ électrique de 8 V/m, quotidiennement 23 heures par jour, durant 1, 3 ou 6 semaines. La température caudale des rats sera enregistrée en temps réel par des caméras infrarouges pendant la période d'exposition aux RF.

Les rats seront hébergés à 3 par cage pour leur socialisation, des enrichissements des conditions d'hébergement des rats seront mis en place tout au long de l'étude pour assurer leur bien-être et ainsi limiter le stress pouvant être ressenti. Du matériau leur permettant de nidifier et des bâtons en bois à ronger seront disposés dans leurs cages d'hébergement pour favoriser leur développement cognitif. A la fin de la période d'exposition, les animaux seront euthanasiés. Pour optimiser l'utilisation des animaux et limiter ou éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, de nombreux échantillons de tissus seront prélevés pour réaliser des analyses biochimiques et immunohistochimiques.

Comme il n'est pas connu à ce jour de mécanisme cumulatif sous l'action de champs radiofréquences de faible intensité pour expliquer les résultats antérieurs, un jalon de cette étude est de confirmer la vaso-constriction décrite précédemment. Il faut s'assurer que ces effets sont répliquables et robustes, et non liés à des artefacts d'interaction entre les ondes radiofréquences et les systèmes d'enregistrement électrophysiologique. Si ce n'est pas le cas, l'étude sera renouvelée à une saison différente, car le fonctionnement de la thermorégulation et en particulier du tissu adipeux brun dépend fortement de la saison : hiver ou printemps au lieu de l'automne.

Les protocoles expérimentaux limiteront fortement l'intensité et la durée de l'inconfort ou de l'angoisse des rats qui seront utilisés, et permettront de réduire au nombre minimum les animaux nécessaires, pour obtenir des résultats concluants. Des procédures d'euthanasie éviteront toute douleur ou angoisse prolongées.

10890 Depuis plusieurs décennies, le cancer est devenu un enjeu médical majeur chez l'Homme comme chez le chien. En effet, le cancer constitue la deuxième cause de décès chez l'Homme dans le monde (8,8 millions de morts en 2015) et la première cause de décès chez le chien adulte (4 millions de décès par an). Les thérapies conventionnelles comme la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie sont les premières lignes de traitement mais leur efficacité reste limitée.

L'immunothérapie est une stratégie thérapeutique visant à stimuler les défenses de l'organisme contre les cellules cancéreuses et pourrait s'avérer être une alternative. Dans ce contexte le développement de l'immunothérapie a permis d'améliorer la prise en charge de patients humains atteints de cancer et pourraient bénéficier aux animaux. Les télomères sont les extrémités des chromosomes, ils jouent le rôle de protecteur du code génétique. A chaque division cellulaire, les télomères rétrécissent, jusqu'à atteindre une taille critique, qui bloque toute nouvelle division des cellules entraînant la sénescence de la cellule, ou son apoptose. De manière physiologique, dans certaines cellules telles que les cellules de la moelle osseuse, un complexe protéique appelé télomérase, a pour rôle de maintenir, ou de rétablir la taille des télomères et de permettre à ces cellules de continuer à se diviser, qualité nécessaire à certains organes telle que la moelle osseuse. Cependant la présence de la télomérase a aussi été détectée en situation pathologique : ainsi elle est sur-exprimée dans 80 à 90% des cellules cancéreuses, et permet leur immortalisation. La télomérase joue donc un rôle essentiel dans la prolifération incontrôlée des cellules tumorales. Le développement de vaccin thérapeutique anti-télomérase semble donc prometteur afin de renforcer l'arsenal disponible en oncologie. Dans ce cadre, la Food and Drug Administration (FDA) a autorisé en octobre 2017 la conduite d'un essai clinique de phase II chez l'Homme pour un vaccin thérapeutique ciblant la télomérase.

Nous développons également un vaccin anti-télomérase. Celui-ci est produit à partir de protéine télomérase synthétisée grâce à la levure *Pichia pastoris*. L'objectif de cette étude est d'évaluer la tolérance d'un vaccin anti-télomérase administré par voie intramusculaire et intradermique chez trois chiens Beagle sains. Trois chiens adultes de race Beagles, seront acclimatés pendant 7 jours. A l'issue de cette période 4 injections quotidiennes par voie intramusculaire (1mg) et intradermique (100µg) de vaccin télomérase seront réalisées. Afin d'évaluer le développement d'effets secondaires, des examens cliniques quotidiens seront réalisés ainsi que des examens sanguins (analyse hématologique et biochimique) et urinaires à J0, J14 et J28. De plus, une évaluation de la réponse immune induite par le vaccin sera réalisée à J14 et J28.

Ce nombre de trois animaux est le plus réduit possible pour démontrer à la fois l'absence de toxicité de notre préparation et de permettre l'évaluation de l'intensité de la réponse immunitaire induite. Par ailleurs, des études de tolérance ont été menées chez la souris et le macaque. Dans ces deux espèces aucun effet indésirable de la vaccination n'a été détecté. Enfin, ce modèle (chiens sains) permettra d'évaluer la tolérance avant une éventuelle administration chez des chiens de propriétaire présentant un diagnostic de processus tumoral.

Les animaux seront hébergés en groupe et, sauf si leur état de santé nécessitait des soins, ils bénéficieront de sorties quotidiennes.

10891 Au sein du laboratoire, nous portons un vif intérêt à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les dégénérescences rétinienne. Des études antérieures sur la dégénérescence rétinienne ont démontré l'implication de voies de signalisation de réponse au stress qu'on appelle l'UPR (Unfolded Protein Response) dans différents modèles. Lorsque le stress perdure, l'activation prolongée de ces voies conduit à la mort des photorécepteurs et au phénotype de rétinopathie pigmentaire. En se basant sur ces connaissances scientifiques, une approche pharmacologique ciblant l'UPR a été développée sur un modèle murin de ciliopathie. Ce traitement composé d'acide valproïque et d'un inhibiteur de GADD34 (protéine impliquée dans les voies de réponse aux stress) a permis de ralentir la mort des photorécepteurs et ainsi retarder la perte d'acuité visuelle chez ces souris montrant l'intérêt thérapeutique de cibler ces voies de signalisation.

Le projet vise à caractériser un nouveau modèle murin de rétinopathie pigmentaire (porteur de la mutation P23H de la rhodopsine cause majeure (restant une maladie rare) de dégénérescence rétinienne non syndromique) en l'absence de la protéine GADD34 (impliquée dans ces voies de

réponses au stress). Cette mutation de la rhodopsine entraîne la production de rhodopsine non fonctionnelle conduisant in fine à l'activation de l'UPR. De ce fait, ce modèle est intéressant pour tester l'implication de GADD34, et son intérêt en tant que cible thérapeutique dans la pathologie.

Le modèle utilisé sera un modèle pertinent et au plus proche de la maladie humaine, le modèle murin mutant de la rhodopsine P23H-KI (Knock-In), combinée à une délétion de la protéine GADD34. L'utilisation d'un modèle murin permettra d'effectuer les tests électrophysiologiques indispensables à l'étude pour lesquels le modèle murin ne peut être remplacé. L'ensemble de l'étude sera réalisé dans le respect de la règle des 3R afin de s'assurer d'utiliser le minimum d'animaux (170 souris au total) et de veiller aux meilleures conditions pour ceux-ci. Les souris seront produites par croisement in situ et concernant le raffinement elles seront placées dans les conditions optimales et surveillées quotidiennement (poids, aspect général de la souris et son comportement dans la cage ainsi qu'avec ses congénères) afin de s'assurer de leur bien-être.

La dégénérescence débutant dès l'ouverture des yeux, les prélèvements rétinienens seront faits précocement à 14, 18 et 21 jours pour les analyses moléculaires et histologiques et des électrorétinogrammes (test électrophysiologique fait sous anesthésie générale) seront réalisés à 1 mois, 2 mois et 3 mois. La taille de la rétine limitant le nombre d'analyse possible sur un même échantillon, 170 souris seront donc nécessaires pour cette étude (39 P23H-KI, 39 GADD34 KO, 39 doubles mutants et 39 WT + 10%). Le nombre de souris ayant étant réduit au maximum, ce nombre correspond au minimum d'animaux nécessaires pour permettre d'obtenir des résultats statistiquement exploitables par des tests de Student (avec un risque α de 5% et une puissance de 80%). Cette caractérisation permettra d'évaluer le rôle de GADD34 dans la pathologie et son intérêt comme cible thérapeutique dans la dégénérescence rétinienne associée à la mutation P23H.

10892 Les hormones permettent à nos organes de communiquer entre eux et jouent ainsi un rôle essentiel au bon fonctionnement et au maintien de nos fonctions physiologiques. Le système nerveux central n'échappe pas à cette règle. En effet, un grand nombre d'hormones produites par nos organes périphériques régulent de manière critique le développement du cerveau, l'activité des neurones, et les fonctions cognitives. Cette régulation est d'autant plus importante qu'une perturbation de ces signaux est source de nombreuses maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer. Cependant, malgré l'importance grandissante donnée aux hormones dans la régulation des fonctions du cerveau, leur mode d'action reste encore largement inconnu. De plus, de nombreuses hormones n'ont pour le moment pas encore été étudiés pour leur effet sur le cerveau. C'est en particulier le cas d'une hormone produite par les glandes parathyroïdiennes : la parathormone (PTH).

Notre intérêt pour la PTH vient du fait que les patients souffrant d'une hyperparathyroïdie, présentent des symptômes métaboliques associés au système nerveux autonome. Nous souhaitons désormais poursuivre cette analyse de manière à identifier et à caractériser le mode d'action et les mécanismes moléculaires et cellulaires contrôlés par la PTH dans le noyau Arqué (hypothalamus), qui est un régulateur du métabolisme et de l'appétit.

L'expérimentation *in vitro* ne permet pas de répondre à toutes les questions. Seule l'expérimentation animale permet d'étudier ce phénomène en conditions physiologiques et physiopathologiques et d'observer les effets de l'inactivation de notre gène d'intérêt dans son ensemble.

Nous utiliserons des souris de 3 mois pour vérifier notre hypothèse, le nombre de souris nécessaire sera de 1860. Pour respecter le principe des 3R, le nombre de souris utilisées sera réduit à son minimum : analyses de paramètre multiples pour chaque souris et utilisation de tests statistiques adaptés.

Différents produits activateurs ou inhibiteurs de la PTH seront injectés aux souris et des modèles murins spécifiques de la PTH seront utilisés et soumis à des mesures de métabolisme et de prise alimentaire (consommation oxygène, boisson, nourriture) via des cages métaboliques. Les effets du régime alimentaire sur la glycémie et la prise de poids seront mesurés. La chirurgie aura lieu sous anesthésie générale pour éviter toute douleur et des antalgiques sont prévus en post-opératoire.

Pour assurer le bien-être des souris, elles bénéficieront de coton et de « maisons » en carton afin de les occuper et afin qu'elles puissent se construire un « nid ». Les souris seront sous surveillance journalière et des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

En résumé, cette étude vise à mettre en évidence et à caractériser les rôles mal connus de la PTH au sein du système nerveux central, plus précisément son rôle de régulateur du métabolisme et de l'appétit par son action sur le noyau Arqué. D'un point de vue clinique, ce travail pourrait identifier le rôle crucial d'une nouvelle hormone périphérique sur les fonctions du système nerveux central et ouvrir de nombreuses perspectives thérapeutiques, en particulier pour les troubles métaboliques observés au cours du vieillissement.

10893 De plus en plus de stratégies vaccinales sont basées sur l'emploi de vecteurs dérivés de virus comme les vecteurs lentiviraux ou adénoviraux. Ces vecteurs, amputés des séquences pathogènes pour l'homme, contiennent des séquences codant pour un antigène vaccinal. Les vecteurs lentiviraux peuvent infecter un large panel de types cellulaires et sont des vecteurs vaccinaux particulièrement efficaces pour l'induction de réponses immunitaires. Ces vecteurs induisent une présentation persistante de l'antigène qui pourrait expliquer cette meilleure réponse immunitaire. Ce n'est pas le cas des vecteurs dérivés de l'adénovirus humain dont l'infection résulte en une présentation transitoire de l'antigène probablement liée à la nature des cellules exprimant l'antigène. Nous souhaitons confirmer cette hypothèse en réalisant une étude comparative des vecteurs lentiviraux et adénoviraux qui examinera d'une part le tropisme de ces vecteurs et d'autre part la durée de la présentation des antigènes par ces vecteurs. L'étude comparative de ces deux vecteurs nous permettra de mieux comprendre la pertinence de leur utilisation en tant que vecteurs vaccinaux.

Pour reproduire ce qui se déroule chez l'homme lors de la vaccination et comprendre les mécanismes basés sur les interactions entre différentes cellules dans divers organes, cette étude doit être menée dans un organisme vivant. De par leur facilité d'emploi et grâce aux nombreux réactifs disponibles, nos expériences seront réalisées sur des souris adultes mâles et femelles.

Une première procédure de sévérité modérée nous permettra de déterminer la dose de vecteur adénoviral à injecter qui permet d'obtenir une réponse immunitaire globale similaire à celle obtenue avec un vecteur lentiviral couramment utilisé dans le laboratoire et dont la réponse immunitaire est connue. Une deuxième procédure de sévérité légère visera à déterminer dans quels organes de l'organisme les deux vecteurs s'expriment et le temps nécessaire après l'injection pour que le pic maximal d'expression soit atteint. Cette procédure permettra également l'identification des populations cellulaires qui expriment l'antigène vaccinal dans les organes. Enfin, une dernière procédure également de sévérité légère nous renseignera sur le déroulement des actions entre le moment de l'injection et l'expression de l'antigène vaccinal dans les organes responsables de l'initiation de la réponse immunitaire. Elle permettra de déterminer si les cellules qui expriment l'antigène vaccinal ont été recrutées au niveau du site d'injection du vecteur ou si elles ont été infectées dans les organes suite à une migration du vecteur.

Les deux types de vecteurs sont couramment utilisés chez la souris et aucune souffrance n'a été reportée. Les expériences seront réalisées par des expérimentateurs formés. Les deux premières procédures ne nécessitent aucune médication. Pour la dernière procédure une anesthésie étant prévue, des soins seront apportés aux souris pour éviter toute douleur et inconfort. Aucun dommage pour les animaux n'est donc attendu, cependant si des signes cliniques sont observés lors de la surveillance, les animaux seront mis à mort. Une compréhension du fonctionnement des vecteurs est déjà acquise et ils seront préalablement caractérisés *in vitro* avant l'emploi chez la souris. Le nombre d'animaux utilisé sera réduit tout en conservant un minimum permettant d'obtenir des résultats interprétables. Grâce aux expériences menées antérieurement et avec l'aide d'un biostatisticien, nous avons déterminé la taille limite de nos groupes pour obtenir des résultats statistiquement significatifs tout en évitant la surutilisation d'animaux.

264 animaux seront utilisés dans ce projet sur une période de 5 ans.

10894 Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie métabolique conduisant à une hyperglycémie caractérisée par les lésions angiopathiques. Sur le plan physiopathologique, ce diabète de type non insulino-dépendant se caractérise par une résistance à l'insuline de l'organisme et une hyperinsulinémie réactionnelle. Le pancréas fabrique de plus en plus d'insuline jusqu'à l'épuisement et lorsque la quantité d'insuline ne suffit plus à contrer les résistances, le taux de glucose dans le sang (glycémie) devient anormalement élevé. Le DT2 est généralement asymptomatique durant de longues années, son dépistage et son diagnostic reposent sur l'examen biologique de la glycémie à jeun ou après stimulation par l'ingestion de sucre (test de tolérance oral au glucose).

Le traitement des patients repose sur des mesures hygiéno-diététiques (hygiène alimentation, exercice physique...) si besoin est complété par des traitements antidiabétiques oraux.

Le corps carotidien est un chémorécepteur sensible aux variations de pH, de pression partielle des gaz respiratoires et de la glycémie participant à la régulation du pH sanguin, de la respiration et de la glycémie de l'organisme. La dénervation des nerfs efférents des corps carotidiens (nerfs sinuso-carotidiens) conduit à une diminution de la prise de poids chez le rat avec un diabète installé et restaure un métabolisme normal chez les rats pré-diabétiques. Ces résultats ainsi que d'autres nous ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance est due à une hyperactivation du corps carotidien et par voie de conséquence du système nerveux orthosympathique. L'hyperactivation du système nerveux orthosympathique aurait notamment un effet sur le tissu adipeux brun en régulant la lipolyse.

L'objectif de cette étude est d'étudier les effets de la dénervation du nerf sinuso-carotidien chez la souris diabétique et savoir si ces effets sont dus à une amélioration de la fonction adipocytaire brun qui passeraient par les récepteurs beta 2 adrénergiques en utilisant des animaux transgéniques. La succession des expériences réalisées est présentée dans l'annexe 1.

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet est de 126. Des tests statistiques seront réalisés à la fin de chaque expérimentation pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs des raffinements sont proposés notamment pour limiter la souffrance animale en mettant en place des protocoles adaptés d'anesthésie et d'analgésie complétés par un suivi postopératoire comprenant la mise en place des points limites précoces et adaptés (cf annexe 1). L'utilisation de l'animal est indispensable à la conduite de cette étude car elle nécessite la préservation de l'intégrité du système nerveux et métabolique.

10895 Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un suivi à long terme de marmottes alpines sur trois populations sauvages vivant dans des environnements très contrastés. Les données collectées visent à décrypter les réponses des organismes vivants aux contraintes de leur environnement et permettent : (1) de comprendre les conséquences directes (anthropisation des milieux, activités récréatives de montagne) et indirectes (changements climatiques) des activités humaines, (2) de proposer des solutions pratiques à des problèmes de société (protection et/ou restauration des espèces et des milieux...). La marmotte alpine est un modèle idéal car vivant dans un environnement extrême et y présentant des stratégies évolutives originales. Son étude est aisée car il s'agit d'une espèce diurne, territoriale, sédentaire et de taille moyenne. Elle constitue le modèle vertébré « sauvage » le plus répandu en milieu alpin. Il s'agit d'une espèce gibier non menacée d'extinction (statut IUCN : préoccupation mineure, LC). Le nombre d'individus adultes et sub-adultes suivis dans chacune des trois populations étudiées est au maximum 200 marmottes, mâles et femelles. Chaque année, un maximum de 100 jeunes marmottes au stade « sevré » sont également suivis, soit 500 jeunes sur 5 ans par population d'étude. L'effectif total impliqué dans l'étude est donc au maximal de $200 + 500 = 700$ individus par population soit 2100 individus sur les trois populations et sur une durée de 5 ans.

Le nombre d'individus suivis a été déterminé afin d'optimiser la puissance statistique tout en minimisant l'effectif impliqué. Néanmoins, le but de notre étude étant d'étudier la variabilité individuelle et de réaliser un suivi démographique, le nombre d'animaux impliqués est plus important que dans des études « en conditions contrôlées ». Grâce à un protocole de capture-marquage-recapture, les individus sont capturés annuellement à l'aide de pièges à trappes, manipulés sur site, puis relâchés sur leur lieu exact de leur capture. Ils sont identifiés à l'aide d'un transpondeur et de

marques auriculaires de manière à pouvoir les reconnaître durant toute leur vie et une prise de sang est réalisée afin de réaliser des mesures physiologiques et génétiques, et assurer un suivi de l'état sanitaire et parasitaire dans les populations. Les individus sont par la suite recapturés annuellement. Les paramètres physiologiques, morphologiques, comportementaux et démographiques (survie et reproduction) de chaque individu sont alors suivis de leur naissance à leur mort. Notre objectif principal étant d'étudier des processus naturels, tout est mis en œuvre pour perturber le moins possible et réduire au maximum l'impact sur les individus que pourrait avoir notre étude. Le temps de manipulation est réduit au strict minimum et les individus sont relâchés au plus proche de l'endroit de leur capture dans les 30 minutes qui suivent leur capture.

10896 Le tube digestif joue un rôle majeur dans la digestion et l'absorption des nutriments provenant de l'alimentation. L'épithélium qui le tapisse est composé de différents types cellulaires directement en contact avec le bol alimentaire. Les cellules épithéliales intestinales constituent de véritables capteurs de l'état nutritionnel et occupent donc une place privilégiée dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Ces cellules participent en effet à la fois à l'absorption des protéines, des lipides et des sucres vers la circulation sanguine mais aussi à l'émission de signaux neuro-endocrines contrôlant notamment la prise alimentaire et l'équilibre glycémique.

Tandis que de nombreuses études ont mis en évidence un métabolisme intracellulaire actif des nutriments par les cellules épithéliales intestinales, le rôle de ce métabolisme dans l'adaptation intestinale à des signaux nutritionnels variés reste mal connu, en particulier dans le cas de pathologies métaboliques telles que le diabète de type 2 (DT2) ou l'obésité.

Dans ce contexte, notre projet vise à identifier et caractériser de nouveaux acteurs participant à l'adaptation de ces cellules en réponse aux sucres alimentaires dans un contexte physiologique et pathologique. Nous chercherons notamment à déterminer si ChREBP, un médiateur essentiel des effets du métabolisme du glucose et du fructose pourrait moduler le programme génique des cellules épithéliales intestinales. Pour étudier les relations entre métabolisme intestinal et maintien de l'homéostasie énergétique, des tests fonctionnels par expérimentation animale seront utilisés et ne pourront être substitués par des analyses réalisées uniquement *in vitro*. Dans ce projet, nous utiliserons deux lignées de souris génétiquement modifiées dont le phénotype n'est pas dommageable. Pour étudier l'effet des sucres alimentaires sur l'épithélium intestinal en conditions normales ou au cours de l'obésité/DT2, ces souris seront nourries avec des régimes enrichis en sucres en absence ou en présence de graisses et nous analyserons l'impact de cette surcharge sur les fonctions intestinales (absorptives et endocrines) et sur l'homéostasie glucidique grâce à des tests fonctionnels dont certains sont non-invasifs.

Le nombre de souris utilisées pour ce projet sera de 640. Nous serons extrêmement attentifs à ce que notre démarche expérimentale soit en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Concrètement, les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement pensés et élaborés afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Nous nous attacherons également à limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, une surveillance journalière des animaux sera réalisée en respectant des points limites bien définis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans la régulation des fonctions intestinales par les sucres alimentaires. Ils pourraient renforcer ou infirmer l'idée selon laquelle l'utilisation de thérapeutiques agissant sur le métabolisme intestinal des sucres pourrait avoir un effet bénéfique chez des patients diabétiques.

10897 Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont une classe hétérogène des leucémies de l'âge adulte. Avec le vieillissement progressif de la population, leur fréquence est destinée à augmenter et elles seront sans doute un problème majeur de santé publique dans les années à venir. Comprendre leur origine et leurs caractéristiques moléculaires sera donc d'une grande utilité pour une meilleure prise en charge des patients. Comme toutes les hémopathies, les LAM sont la conséquence de nombreuses anomalies génétiques acquises au cours du temps. Ces dernières années, il est

apparu que les premières anomalies génétiques responsables de l'apparition des LAM affectent, dans une majorité des cas, des gènes codant des facteurs de transcription nécessaires à l'initiation et la régulation de l'expression d'autres gènes, ou encore des gènes connus pour modifier l'ADN des cellules (gènes impliqués dans des mécanismes d'« épigénèse »).

Spi1 est un facteur hématopoïétique indispensable au développement des cellules B et myéloïdes et qui doit être peu exprimé pour une érythroïèse et lymphopoïèse T. L'expression anormalement forte de Spi1 entraîne une leucémie érythroïde, en plusieurs étapes, dans un modèle de souris transgénique. Des mutations activantes de Spi1 ont été identifiées chez des patients qui développent des lymphopathies B et des réarrangements de chromosomes associés à des gains de fonctions de Spi1 ont été mis en évidence chez des patients atteints de leucémie aigue lymphoïde T. Comment Spi1 favorise la survenue des leucémies et quels sont les autres événements moléculaires qui coopèrent avec Spi1 et permettent l'émergence des cellules tumorales reste inconnu. Parmi les facteurs qui interagissent avec Spi1, TET2 est un facteur épigénétique qui modifie la méthylation de l'ADN, jouant un rôle dans le contrôle de l'expression des gènes. TET2 est fréquemment muté dans les hémopathies myéloïdes mais aussi lymphoïdes B et T, et les mutations retrouvées conduisent à une perte de fonction de TET2.

Notre hypothèse est que l'expression forte de Spi1 ou sa mutation modifie le recrutement de TET2 à l'ADN, altérant ainsi l'activité normale de TET2. Son activité ainsi modifiée serait nécessaire au développement de la leucémie chez les souris transgéniques. En associant l'expression forte de Spi1 ou sa mutation à la perte de fonction de TET2, le développement de leucémie devrait être freiné chez la souris. Ce projet se divise en deux objectifs. Le premier objectif consiste à étudier la combinaison (expression forte de Spi1 et perte de fonction de TET2) dans l'établissement du phénotype tumoral érythroïde. Le second consiste à étudier l'activité d'un mutant de Spi1 (Spi1PM) associée à la perte de TET2 dans l'hématopoïèse normale et l'établissement de tumeurs.

Des résultats préliminaires ont été obtenus *in vitro*. L'expression du mutant Spi1 (Spi1PM) dans des lymphocytes B naïfs conduit à l'augmentation de la prolifération cellulaire et à un blocage de différenciation. Nous avons également mis en évidence que le mutant Spi1PM se fixe sur de nouveaux gènes cibles, identifiés en ChIPseq. Ces résultats confortent notre hypothèse selon laquelle l'expression anormale de Spi1 ou sa mutation pourrait modifier le recrutement de TET2 à l'ADN et ainsi affecter son activité ; générant de nouveaux gènes cibles et modifiant le programme transcriptionnel, contribuant à la leucémogénèse. Notre objectif est de déterminer comment Spi1 module la spécificité et l'activité de TET2 dans l'hématopoïèse normale et comment les modifications de telles interactions pourraient être impliquées dans l'apparition des hémopathies. Pour cela, l'établissement de lignées de souris génétiquement modifiées reproduisant les anomalies moléculaires d'intérêt et la maladie leucémique est indispensable.

Ce projet est une étude pilote. Nos hypothèses de travail ont tout d'abord été validées *in vitro* sur des modèles cellulaires établis. Pour découvrir le processus de transformation tumorale *in vivo*, nous utiliserons les souris génétiquement modifiées surexprimant Spi1 ou Spi1 muté, que nous croiserons à des souris présentant une perte de fonction pour TET2. La mise en oeuvre des deux objectifs nécessitera 570 souris.

Toutes les interventions invasives seront faites sous anesthésie générale (prélèvements de sang et injections). Les animaux bénéficieront d'un environnement enrichi en tout temps et seront examinés quotidiennement. Du DietGel Energy sera ajouté dans les cages en cas de diminution de la prise alimentaire. Le nombre d'animaux choisi pour chaque lot représente le minimum requis pour constituer un échantillonnage représentatif et mesurer les effets attendus de façon fiable. Les données obtenues sur chaque animal seront optimisées en analysant simultanément plusieurs organes du même animal ; ce qui est un point de réduction et de raffinement.

10898 L'objectif de ce projet est de valider la faisabilité et l'efficacité de nouvelles molécules (inhibiteurs métaboliques) dans le traitement du Glioblastome Multiforme (GBM). Le GBM est la tumeur primaire du système nerveux central la plus fréquente et la plus agressive (<5% de patients survivants à 5 ans) malgré les traitements actuels très agressifs (chirurgie suivie de radio- et chimiothérapie).

Trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment par des approches personnalisées, et identifier de nouveaux biomarqueurs tumoraux est indispensable.

Nous avons développé une banque de cultures primaires de GBM directement dérivées de tumeurs de patients. Notre protocole de culture permet de maintenir l'hétérogénéité cellulaire, génétique et moléculaire de la tumeur initiale nous permettant d'évaluer l'efficacité d'un protocole thérapeutique en tenant compte de la diversité de réponse des patients. Nos récents travaux nous ont permis de différencier ces tumeurs en 2 grands groupes : MES (mésenchymateux) et CNP (regroupement de Classique, Neural et Proneural). Nous avons également identifié de nouvelles cibles thérapeutiques dans les voies métaboliques impliqués dans la prolifération cellulaire et différenciellement exprimés en fonction du groupe de GBM.

Des souris immunodéficientes NOD-SCID-IL2Rg (NSG) seront utilisées comme modèle animal de développement de tumeurs de GBM humaines par greffe de cellules tumorales. Par la suite, ces souris recevront une administration d'un inhibiteur métabolique selon différents protocoles usuellement utilisés en clinique et/ou dans la littérature, en association aux chimiothérapies.

Globalement, ce projet devrait nécessiter l'utilisation de maximum 621 animaux. Pour limiter au mieux le nombre d'animaux, différentes étapes seront réalisées successivement pour définir les conditions expérimentales optimales.

- Développement et caractérisation de 10 modèles de tumeurs de GBM à partir des cultures primaires en fonction du groupe (MES et CNP) et des caractéristiques de croissance tumoral de chacun.

- Vérification de la non-toxicité des molécules thérapeutiques considérées à partir de souris contrôles, en association avec des molécules de chimiothérapie (Temozolomide, Etoposide). Les doses non toxiques (Dose Maximale Tolérée) et les voies d'administration envisagées seront issues de la littérature et décrite comme efficace. Les groupes contrôles seront communs et nécessiteront 3 lots de 4 souris (contrôle, Chimiothérapie1 et Chimiothérapie2). L'utilisation de 3 lots de 4 souris sera également nécessaire pour chaque inhibiteur métabolique (Molécule seule, Combinaison1 et Combinaison2).

- Evaluation de l'efficacité thérapeutique en fonction des molécules injectées et de la chimiothérapie associée dans les modèles les plus pertinents établis précédemment (1 modèle par groupe MES/CNP). Pour chaque modèle, nous utiliserons 6 groupes de 7 souris (contrôle, Chimiothérapie1, Chimiothérapie2, Molécule seule, Combinaison1 et Combinaison2).

- Confirmation du bénéfice thérapeutique des molécules validées dans les étapes précédentes (non-toxicité et évaluation thérapeutique) dans plusieurs modèles de GBM (2 à 3 modèles par groupe MES/CNP). Des lots de 7 souris seront utilisés, nombre minimum d'animaux afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables (test du log-rank).

Afin de prévenir au maximum la souffrance de l'animal, les souris seront suivies quotidiennement et euthanasiées au moindre signe de souffrance (perte de poids >10%, prostration, poils hérissés...)

10899 Contexte du projet :

Le microbiote intestinal joue un rôle clé dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Dans la maladie de Crohn, certaines populations de bactéries bénéfiques pour l'hôte sont diminuées au sein du microbiote intestinal au détriment de bactéries dites 'agressives'. De même, il a été observé une expression anormalement forte d'une protéine au niveau de la muqueuse iléale de ces patients comparativement à des sujets sains. Cette protéine favorise l'attachement de bactéries adhérentes et invasives à potentiel pro-inflammatoire à la muqueuse, en jouant le rôle de récepteur pour ces bactéries.

La recherche préclinique a permis de montrer qu'une fois attachées, ces bactéries adhérentes et invasives colonisaient fortement la muqueuse intestinale de souris transgéniques exprimant le récepteur humain aux bactéries, traversaient la muqueuse et induisaient une inflammation intestinale et des symptômes de diarrhée. Le régulateur OmpR joue un rôle essentiel dans la virulence de ces bactéries adhérentes et invasives en leur permettant de s'adapter à un

environnement intestinal où règnent une forte osmolarité et des variations de pH importantes. En effet, des expériences ont été menées *in vitro* en utilisant des milieux mimant les conditions de salinité et de pH rencontrées dans l'intestin et des lignées de cellules intestinales humaines. En l'absence de OmpR, les bactéries perdent leur capacité à produire les appendices leur conférant mobilité et capacité d'attachement à la muqueuse et perdent ainsi leur capacité à adhérer et à envahir les cellules intestinales en culture.

L'influence de OmpR sur la virulence des souches adhérentes et invasives n'a pas encore été étudiée en modèle préclinique. Il est nécessaire de savoir si l'absence de cette protéine régulatrice aura une répercussion sur la capacité des bactéries à coloniser l'intestin et sur leur capacité à induire une inflammation intestinale. Les souris transgéniques exprimant le récepteur humain aux bactéries adhérentes et invasives au niveau du colon sont un modèle de choix pour cette étude de colonisation. La mise en évidence de l'implication du régulateur OmpR dans la virulence de ces bactéries à potentiel pro-inflammatoire ouvrirait de nouvelles pistes thérapeutiques dans la maladie de Crohn. Une innovation serait de développer des molécules ciblant ce régulateur bactérien pour éliminer spécifiquement ces bactéries chez les patients atteints de maladie de Crohn. Ce type de thérapie personnalisée ciblant le microbiote intestinal représente un grand espoir dans ces pathologies où les traitements actuels visent à diminuer l'inflammation intestinale sans en soigner la ou les origines.

L'objectif du projet est d'étudier, chez des souris transgéniques exprimant le récepteur humain aux bactéries, la capacité de colonisation de l'intestin de 3 souches de bactéries adhérentes et invasives isolées de patients atteints de maladie de Crohn sélectionnées pour leurs fortes capacités d'adhésion à des cellules en culture. Ces niveaux de colonisation seront comparés à ceux de leurs mutants respectifs dépourvus de OmpR, afin d'évaluer le rôle de OmpR sur la colonisation intestinale (6 lots de souris au total).

-Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit au minimum, dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet. Le nombre de 8 animaux par lot a été déterminé pour assurer des résultats statistiquement significatifs. En considérant 6 lots (3 souches et leurs 3 mutants), les essais nécessiteront au total 48 souris.

-La durée totale du projet est de 9 mois, elle prend en compte le temps de génération des animaux transgéniques exprimant le récepteur humain aux bactéries et la réalisation du projet scientifique.

-Les bactéries seront administrées par voie orale à la dose de 3×10^9 bactéries/souris.

-La colonisation bactérienne sera évaluée dans les jours suivant l'infection (jours 1, 2, 3, 6, et 7) par quantification des bactéries dans les fèces. Suite à des études antérieures menées sur ce modèle murin, nous savons que le nombre de bactéries adhérentes et invasives dans les fèces des animaux reflète le nombre de bactéries attachées à la muqueuse intestinale. Ce prélèvement de fèces permettra également de doser des biomarqueurs de l'inflammation intestinal.

-Les animaux seront surveillés quotidiennement pour le développement de signes de diarrhée.

-Les animaux seront mis à mort 7 jours après l'infection par anesthésie par inhalation d'isoflurane puis dislocation cervicale.

-Les animaux seront disposés dans des cages de 450 cm² (4 animaux par cages). Une période d'acclimatation sera réalisée avant le début de la procédure (une semaine). Un enrichissement est proposé aux souris : lamelles de cartons compressées et maisonnettes.

-Les quantifications bactériennes et dosages de biomarqueurs d'inflammation dans les fèces sont favorisés en raison du caractère non-invasif et non douloureux de la méthode de prélèvement. Cela limite le nombre d'animaux en évitant de mettre à mort des animaux à différents temps post-infections uniquement pour la quantification des bactéries attachées à la muqueuse intestinale.

-Une inflammation intestinale légère à modérée est attendue en réponse à l'infection bactérienne des animaux. Les animaux sont donc surveillés quotidiennement pour tout signe de souffrance.

-Si un animal remplit 3 des critères suivants (points limites) :

1/perte de poids > à 15%

2/immobilité, ou position recroquevillée, ou dos vouté, ou augmentation de la fréquence respiratoire/respiration pénible

3/signes cliniques d'inflammation intestinale (pelage et orifices souillés avec diarrhée et/ou présence de sang dans les fèces)

il sera immédiatement sorti du protocole et euthanasié par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane.

-Un maximum de prélèvements sera réalisé sur les animaux à la fin du protocole :

-prélèvements de tissus intestinaux à différents niveaux du tube digestif pour quantifier le nombre de bactéries attachées aux muqueuses, pour mesurer la réponse inflammatoire en réponse aux bactéries et pour réaliser des études histologiques.

-prélèvements de foie, de rate, de ganglions lymphatiques pour étudier la translocation des bactéries depuis l'intestin.

10900 Le protocole suivant concerne la constitution d'une biobanque d'échantillons biologiques (sang, salive, urines, fèces, poils et tissus) sur des chats et chiens âgés de plus de 2 mois (410 chats/ 350 chiens sur 5 ans). Le but est de pouvoir réaliser des analyses sur ces échantillons biologiques a posteriori sur différentes thématiques de recherche.

Les chats et chiens de notre structure pourront être amenés à être prélevés jusqu'à 6 fois par an pour les échantillons de sang (sang total, sérum, plasma, culot cellulaire et buffy coat) ; une fois par mois pour les échantillons de poils, quotidiennement pour les échantillons de salive. Aucune limite de fréquence pour les échantillons de fèces ou urine à partir du moment où la collecte se fait sans restriction de l'animal en lodge. En cas de restriction en lodge, la collecte d'urines et de selles ne pourra se faire sur plus de 5 jours consécutifs avec un laps de temps minimum de 2 semaines entre chaque collecte.

Ce projet d'étude a été conçu de manière à respecter la législation française et européenne en vigueur pour l'expérimentation animale et répond aux impératifs des 3R. La partie substitution (Replacement) n'est pas envisageable sur ce projet puisque les échantillons doivent être réalisés sur les espèces cibles (chats et chiens). La partie réduction (Reduction) a été prise en compte en tenant compte du laps de temps pour observer des évolutions sur les paramètres biologiques envisageable à ce stade. Enfin, la partie raffinement (Refinement) est prise en compte par la socialisation de nos chiens et chats dès leur plus jeune âge afin qu'ils soient totalement accoutumés aux manipulations liées aux prélèvements biologiques de ce projet.

10901 L'hyperactivité vésicale se caractérise par la contraction du détrusor (muscle lisse de la vessie), avant même que la vessie soit pleine, provoquant une envie soudaine et parfois extrêmement pressante d'uriner.

Les principaux symptômes de l'hyperactivité vésicale sont donc : une urgenturie mictionnelle, une fréquence mictionnelle augmentée (besoin d'uriner au moins huit fois pendant la journée), une nycturie (se réveiller plus de deux fois pendant la nuit pour uriner) et une incontinence urinaire (fuites urinaires). En Europe comme aux Etats-Unis, on estime que l'hyperactivité vésicale affecte environ 16% de la population, dont un tiers présente également une incontinence urinaire (principalement des femmes). Les traitements de première intention n'apportent pas toujours des résultats satisfaisants.

Les méthodes alternatives *in vitro* et *ex vivo* permettant l'étude de l'hyperactivité vésicale dans son ensemble n'existent pas. C'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre et traiter cette pathologie. Ainsi différents modèles expérimentaux ont été développés dont un modèle de contractions vésicales induites par un agent contractant chez le rongeur.

L'objectif de ce projet est d'évaluer, chez le rat, l'effet de candidats médicaments, sur l'amplitude des contractions vésicales induites par un agent contractant en dose unique ou en doses croissantes, mais aussi sur l'augmentation de la salivation, effet secondaire invalidant observé chez les patients traités par des médicaments contre l'hyperactivité vésicale.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement adapté sera introduit dans l'hébergement des animaux afin de les stimuler (tel que des aspens brick (morceau de bois) ou des tunnels en polycarbonate). Bien que la procédure expérimentale soit sans réveil, avant démarrage de l'étude, un suivi journalier des animaux sera effectué par les zootechniciens y compris les week-ends. En accord avec la règle de raffinement, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffant. Lors des chirurgies, les animaux seront placés sur tapis chauffant afin d'améliorer le raffinement. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 576 rats sur 5 ans.

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

10902 Les cellules souches pluripotentes sont de cellules très immatures capables de donner tous les types de cellules du corps humain en grande quantité. Ces cellules ont un grand intérêt thérapeutique, elles peuvent produire des cellules spécialisées afin de remplacer dans un organisme les cellules mortes ou malades. En particulier, l'obtention de cellules hématopoïétiques (sanguines) et des vaisseaux dérivés des cellules souches pluripotentes humaines serait d'une grande utilité pour disposer de beaucoup de cellules à greffer pour des maladies telles que les leucémies ou d'autres maladies sanguines et pour des maladies touchant le système vasculaire.

Les cellules pluripotentes appelées « cellules souches embryonnaires » (ES) ont été dérivées de l'embryon humain aux tout premiers stades de son développement, quelques jours après la fécondation. *In vitro*, ces cellules dites "pluripotentes" peuvent donner de cellules à l'infini et se différencier en plus de 200 types de tissus différents. En 2012, le Prix Nobel de Médecine a été attribué au professeur Yamanaka pour avoir découvert que des cellules spécialisées (matures) d'un organisme adulte pouvait être reprogrammées afin de redevenir pluripotentes, comme les cellules souches de l'embryon. Ces cellules ont été appelées « cellules souches pluripotentes induites » (iPS) elles peuvent à leur tour se différencier vers tous les tissus de l'organisme comme les cellules ES. Cette technologie permet de disposer d'un nombre infini de cellules provenant du même patient et envisager une thérapie personnalisée sans problème de rejet de la greffe.

La transplantation de cellules hématopoïétiques en vue des traitements des leucémies ou d'autres maladies sanguines, nécessite une grande qualité des cellules, provenant soit du sang de cordon ombilical, soit de sang périphérique, soit de moelle osseuse, cellules qui doivent être compatibles avec le patient. Bien qu'aujourd'hui il existe des banques des cellules, utilisables pour la greffe de moelle osseuse, les besoins en cellules hématopoïétiques restent importants. De même, pour les malades atteints d'ischémie, les cellules endothéliales à greffer proviennent aussi du sang de cordon ombilical, du sang périphérique ou de la moelle osseuse, nécessitant aussi un nombre important des cellules à greffer.

Les cellules souches pluripotentes humaines : cellules ES et iPS, peuvent donner un type de cellule (appelée l'hémangioblaste) qui peut se différencier à la fois en cellules hématopoïétiques et endothéliales. Notre projet est de produire des cellules sanguines et endothéliales fonctionnelles en grande quantité à partir l'hémangioblaste. Nous maîtrisons la différenciation des cellules ES et des iPS vers l'hémangioblaste et l'engagement de ces dernières vers les cellules sanguines et endothéliales *in vitro*. Cependant, la preuve irréfutable que nous obtenons les bonnes cellules à partir des cellules souches embryonnaires humaines (ES et iPS), est que ces cellules aient la capacité d'une part, de reconstituer le sang de patients et d'autre part, de former des vaisseaux après une occlusion de la circulation sanguine. Des expériences chez la souris sont indispensables car jusqu'à présent la greffe de cellules hématopoïétiques et la revascularisation d'un site lésé sont de processus multiparamétriques et impossible de reproduire *in vitro*. En conséquence, avant de pouvoir utiliser ces cellules chez les malades il est indispensable de les tester chez la souris car pour les études de greffe de cellules humaines la souris est le modèle de référence.

Nous veillerons à ne pas utiliser plus d'animaux que le strict nécessaire pour nos expériences. Nous estimons à 548 le nombre de souris qui seront utilisées pour notre projet (la durée du projet est estimée à 4 ans). Les animaux seront surveillés tous les jours au début de l'expérience puis un suivi hebdomadaire, ou plus fréquemment si besoin, afin de déceler s'il y a des signes de souffrance. Les expériences *in vivo* (reconstitution hématopoïétique et d'ischémie) seront réalisées seulement avec les lignées de cellules ES et iPS validés au préalable *in vitro*.

Dans une démarche éthique de réduction du nombre d'animaux utilisés, 8 groupes de cellules seront étudiées, dérivés de 3 lignées de ES (H1, H9 et SA01) et de 5 lignées d'iPS, auxquels se rajoutent 2 groupes contrôles à savoir le PBS (témoin négatif) et des cellules isolées de sang de cordon ombilical (témoin positif). Les deux protocoles se réaliseront sous anesthésie pour réduire le stress et la souffrance subis par les souris et faciliter leur manipulation. Dans tous les cas, les animaux bénéficieront d'un enrichissement environnemental sous forme de cocons et des boîtes de diet gel seront à leur disposition pour favoriser l'accès à la nourriture. Ainsi l'ensemble des procédures sera réalisé dans le respect de la règle des 3R et du bien-être de l'animal.

10903 L'impossibilité de traiter des infections causées par des bactéries résistantes à l'ensemble des antibiotiques disponibles est devenue une réalité, et essayer de contrôler l'émergence et la dissémination de ces multi-résistances est l'un des enjeux prioritaires de santé publique. Cette émergence est entre autre expliquée par l'acquisition, par les pathogènes, de gènes de résistances présents sur des molécules d'ADN dites mobiles, capables d'être transférées entre souches ou même espèces bactériennes différentes. Les filières d'élevage d'animaux de rente sont considérées comme de fortes contributrices de cette émergence, de par leur consommation importante d'antibiotiques. Ainsi, les flores bactériennes (microbiotes) des animaux étant régulièrement exposées aux antibiotiques, elles ont accumulé les gènes de résistance mobiles et pourraient faire office de réservoir pour les agents pathogènes zoonotiques.

Toutefois, malgré de nombreuses études démontrant cette accumulation, les bactéries porteuses de ces gènes restent à ce jour inconnues, de même que la fréquence à laquelle se font les échanges de gènes au sein du microbiote.

Le présent projet a pour objectif de déterminer les espèces bactériennes du microbiote intestinal aviaire capables d'acquérir un vecteur mobile de résistance donné, et à quelle fréquence. Des poussins seront infectés en début de vie avec une bactérie de laboratoire porteuse d'un vecteur de résistance marqué, et les bactéries ayant acquis ce vecteur seront identifiées tout au long de la vie des animaux par des méthodes de culture bactérienne et des méthodes de séquençage haut débit sans culture préalable. Un total de 66 animaux au maximum sera utilisé, répartis en deux expérimentations.

Ces expérimentations répondent aux exigences de la règle des 3 R :

Remplacement : A ce jour, il n'existe pas de modèle *ex vivo* capable de reproduire la complexité de la communauté microbienne intestinale des animaux. L'étude des échanges de gènes de résistance au sein du microbiote aviaire ne peut donc se faire que via des expérimentations animales.

Réduction : Le nombre d'animaux est réduit au minimum statistique possible, avec l'incertitude inhérente au caractère pilote de ce projet.

Raffinement : Les animaux seront maintenus dans des hébergements adaptés en taille, dans des conditions environnementales contrôlées, avec nourriture et boisson à volonté. Ils bénéficieront d'un enrichissement social et comportemental systématique. La bactérie utilisée pour l'infection engendre a priori un portage asymptomatique, donc sans douleur, et aucune procédure n'est considérée comme douloureuse pour l'animal. Il n'y a donc pas de disposition particulières à prendre pour réduire la douleur. L'apparition de signes cliniques d'infection sera toutefois surveillée.

10904 Les coccidioses aviaires sont des maladies dues à l'infection par des petits parasites, comme par exemple les coccidies du genre *Eimeria*, qui sont très fréquentes et d'un intérêt sanitaire et économique majeur. Les parasites se développent dans le tube digestif des oiseaux et entraînent une mauvaise absorption de la nourriture et des lésions plus ou moins profondes l'intestin. Les

coccidioses sont ainsi caractérisées par des retards de croissance, de la diarrhée, de l'apathie et de la prostration, parfois de la mortalité. Elles affaiblissent les oiseaux et favorisent l'émergence d'autres troubles liés à des agents pathogènes (bactéries, virus ou autres parasites que les coccidies) opportunistes. Les moyens de lutte ciblée contre les coccidioses sont peu nombreux, parfois onéreux et certains sont confrontés à l'émergence de phénomènes de résistance chez les parasites. Notre projet vise à améliorer la résistance du poussin aux maladies par une meilleure gestion des conditions de stockage des œufs avant incubation. Nous souhaitons vérifier dans cette procédure expérimentale si ces conditions permettent d'augmenter leur résistance aux coccidioses en particulier. Cela sera évalué par l'observation des animaux malades, de la dégradation de l'aspect des matières fécales, de l'excrétion parasitaire, des lésions au niveau du tube digestif et de la croissance des animaux. Pour ce projet, 240 poussins seront utilisés (40 poussins par lot, 6 lots comparés) afin d'avoir un effectif suffisant pour une exploitation statistique fiable. Le recours aux animaux est indispensable car il n'existe pas de méthode alternative pour étudier la résistance aux coccidioses. Les poussins seront infectés à 8 et 18 jours par voie orale avec des doses infectieuses adaptées aux besoins. Le suivi quotidien dure 16 jours après la première inoculation. Une grille de point limite (comportements, symptômes) a été définie afin de limiter au maximum la souffrance des animaux. Afin d'améliorer leur bien-être durant l'expérimentation, les animaux seront logés dans des cages enrichies avec des matériaux dans lesquels ils peuvent picoter, et ainsi exprimer leur comportement naturel.

10905 La mort subite et inattendue liée à l'épilepsie (SUDEP) représente une cause majeure de décès prématuré chez les 15 à 20 millions de patients épileptiques pharmaco-résistants, touchant surtout les jeunes adultes. Hormis l'optimisation du traitement antiépileptique, aucun traitement préventif spécifique des SUDEP n'est disponible.

Bien que les mécanismes entraînant une SUDEP restent inconnus, les données expérimentales et cliniques suggèrent une dysfonction respiratoire en lien avec une crise, évoluant vers l'apnée terminale, puis l'arrêt cardiaque.

En plus du dysfonctionnement respiratoire menant au décès, il a été montré que la répétition des crises entraîne une altération chronique progressive de la régulation respiratoire.

En effet, en clinique, les patients présentent des apnées au cours d'un tiers de leurs crises.

Chez l'animal, des altérations respiratoires ont été observées chez des rats souffrant chroniquement de crises spontanées. Ainsi, 5 semaines après un état de mal épileptique (EME) induit par pilocarpine, 40% des rats présentaient des troubles respiratoires chroniques associées aux crises spontanées.

L'existence d'un lien entre la respiration et le système sérotoninergique est aujourd'hui bien établie. Ainsi, il a également été suggéré qu'un dysfonctionnement sérotoninergique augmenterait les troubles respiratoires et le risque de SUDEP.

Actuellement, en dehors de la mesure de l'hypoxémie lors d'une crise (pas toujours facilement réalisable), il n'existe aucun marqueur clinique validé associé à ces dysfonctions respiratoires.

Les micro-Acide Ribonucléiques (miARN) sont des petites molécules d'ARN endogènes non-codants essentiels à la régulation des gènes et de la plupart des protéines humaines.

Stables dans le sang, les miARN circulants peuvent être détectés et utilisés comme un outil de diagnostic. Un certain nombre d'études ont montré des résultats encourageants dans le cancer mais également dans certaines atteintes cérébrales comme la dépression ou la maladie d'Alzheimer.

Récemment, des études ont porté sur le lien entre les voies contrôlées par les miARN et l'épilepsie, en mettant l'accent sur la régulation de l'épileptogénèse. Ainsi, des données obtenues sur des échantillons de tissus obtenus après chirurgie de l'épilepsie ont montré une dérégulation de la voie de synthèse des miARN chez les patients atteints d'épilepsie.

Chez l'animal, des études ont montré que l'inhibition d'un miARN peut supprimer le développement de crises spontanées alors que la délétion d'un autre miARN peut entraîner une épilepsie fatale.

Des études ont identifié un ensemble de miARN circulants spécifiques chez des patients souffrant d'épilepsie. Bien que ces résultats puissent valider l'idée que ces miARN soient informatifs, ils restent très préliminaires et centrés sur le processus épileptique et non sur la dysfonction respiratoire liée aux crises.

L'objectif de cette étude est donc d'identifier des miARN circulants spécifiquement associés aux dysfonctionnements respiratoires observés dans un modèle préclinique très courant d'épilepsie pharmacorésistante : le modèle d'épilepsie induite par injection de pilocarpine chez le rat Sprague-Dawley.

Après induction, la phase de transformation du cerveau sain en cerveau épileptique, appelée « épileptogénèse » se produit, des crises récurrentes et spontanées apparaissent et sont associées aux premiers troubles comportementaux, modélisant les troubles et symptômes observés chez les patients épileptiques.

Après installation de l'épilepsie, une proportion de 40% de rats présente des troubles respiratoires. Ces rats seront alors identifiés par mesure de la ventilation respiratoire.

Au décours de l'expérience, des prélèvements sanguins seront effectués par la veine de la queue, à différents temps, afin d'essayer d'identifier des profils distincts de miARN entre les rats présentant ou non des troubles respiratoires. Les échantillons sanguins seront analysés par biologie moléculaire.

Application de la règle des 3R et nombre d'animaux

Cette étude prévue sur 2 ans nécessitera l'utilisation de 90 rats : cet effectif a été déterminé sur la base de la fréquence de survenue de troubles respiratoires dans le modèle EME (40%) en vue d'obtenir environ 20 rats par groupe.

L'induction de l'EME peut altérer le bien-être des animaux et entraîner une diminution de la prise alimentaire. L'état général des animaux sera donc observé pluri-quotidiennement, leur poids mesuré quotidiennement et, dans les premiers jours, une alimentation à l'aide de croquettes ramollies et une hydratation au biberon seront mises en place. Un massage abdominal quotidien sera pratiqué afin de les aider à retrouver la motilité intestinale affectée, cela permettant à l'animal de retrouver un bon état général rapidement.

Une grille de score sera mise en place afin d'évaluer, selon des critères précis, si des signes de mal-être apparaissent. Si tel est le cas, les animaux concernés seront sortis de la procédure et des mesures adéquates seront prises pour faire évoluer favorablement leur tableau clinique.

10906 Chez les vertébrés, le système nerveux central (SNC, cerveau, tronc cérébral (TC) et moelle épinière (ME) baigne dans le liquide cébrospinal (LCS) dont la composition est proche de celle du plasma avec la présence de molécules bioactives (ex. neurotransmetteurs, neurotrophines et signaux de l'immunité et inflammatoires). Le LCS représente un système de communication de type volumique grâce auquel une molécule bioactive libérée dans une région du système ventriculaire est susceptible de parcourir de longues distances et d'agir de manière globale sur le SNC. De nombreuses études au cours de ces dernières décennies ont démontré que le LCS jouait un rôle primordial dans le développement et la physiologie du SNC ainsi que comme source d'information sur son état physio-pathologique. Au niveau du canal central (CC), il existe une population neuronale unique (les neurones de contact du LCS, Nc-LCS) qui est à l'interface entre LCS et tissu nerveux et par conséquent en position stratégique pour assurer la détection et l'intégration des signaux circulant et en transmettre l'information recueillie vers des cibles qui doivent être identifiées. Ces Nc-LCS représentent une population neuronale conservée chez tous les vertébrés et correspondrait à un nouveau système sensoriel intrinsèque du SNC important pour en assurer l'activité du SNC en conditions physiologiques et l'informer en situations pathologiques. Il vise à caractériser, pour la première fois chez le mammifère, les propriétés des Nc-LCS au niveau moléculaire et cellulaire, de déterminer quelles molécules et neurotransmetteurs modulent leur activité et quelles sont les conséquences de cette activation sur l'activité et la physiologie du SNC de mammifère. Par ailleurs, nous étudierons la connectivité des Nc-LCS afin d'identifier quels sont leurs partenaires pré- et post-synaptiques.

A ce jour, l'étude des Nc-LCS pour en déterminer la fonction dans le SNC nécessite une analyse au niveau physiologique et intégré que seul un modèle animal permet. A ce titre, la souris, pour laquelle des données expérimentales existent déjà pour les Nc-LCS, offre l'avantage unique de permettre la génération de modèles transgéniques pour visualiser, isoler et manipuler spécifiquement les Nc-LCS autour du CC. Notre projet sera mené avec le souci de suivre la règle des 3R (Réduction, Remplacement et Raffinement) et nous mettons en place une gestion rigoureuse de la production et de l'utilisation des animaux d'expérimentation et d'autre part des procédures d'expérimentation pour limiter le stress, l'angoisse et toute souffrance animale. Par ailleurs, nous utilisons un environnement enrichi pour reproduire au mieux un espace d'hébergement proche des conditions naturelles afin d'assurer le bien-être (nidification, jeu), la stimulation de leur curiosité et le maintien de relations sociales (animaux maintenus en groupe) pour les animaux.

Notre projet nécessite en fonction de nos études l'utilisation d'animaux transgéniques portant des modifications génétiques spécifiques aux Nc-LCS mais non-dommageables pour l'animal. Sur les 5 prochaines années, nous estimons utiliser 547 animaux (tout modèle confondu soit environ 100 animaux/an) pour mener le projet proposé. En parallèle, les animaux qui ne seraient pas porteurs des mutations recherchées seront utilisés pour nos études histologiques. Nous créons par ailleurs une banque de tissu pour optimiser l'utilisation des tissus spinaux prélevés. Ces mesures permettront de réduire le nombre d'animaux d'expérimentation utilisés. Par ailleurs, bien qu'il ne soit pas possible d'avoir exclusivement recouru à des modèles alternatifs, nous développons une approche *in vitro* qui permettra, au moins en partie, de remplacer et limiter l'utilisation d'animaux d'expérimentation. Enfin, pour toutes nos études, nous mettons en place des procédures d'analgésie pré-opératoire et d'anesthésie/analgésie pendant le prélèvement des tissus pour assurer l'absence de stress et de douleur chez l'animal.

10907 Bien que peu fréquent (entre 0,2 et 0,5% ; ≈ 400 /an en France), l'accident de décompression (ADD) peut entraîner une invalidité permanente (de type hémiplégie, paraplégie ou tétraplégie), voir le décès, et représente ainsi un risque majeur chez le plongeur subaquatique. L'ADD touche non seulement les plongeurs loisir, mais aussi l'ensemble des personnes exposées à des différentiels de pression importants : patients et personnel fréquentant des chambres hyperbares, plongeurs militaires, pilotes (en cas de montée rapide en altitude), astronautes (lors des sorties spatiales extravéhiculaires), tunneliers. Depuis les travaux de Paul Bert, il est admis que l'ADD est la conséquence de la formation de bulles dans la circulation sanguine, se comportant comme des corps étrangers. Les paliers de décompression qu'effectuent les plongeurs lors du retour vers la surface visent à prévenir cet accident en diminuant la formation de bulles intravasculaires. Cependant, des ADD continuent d'être rapportés malgré le respect des procédures de décompression, soulignant l'intérêt d'améliorer la prévention et le traitement de cette pathologie.

A l'échelle de la population, le risque d'ADD est corrélé à la quantité de bulles circulantes. Cette dernière dépendant à la fois de la quantité de gaz dissous dans l'organisme pendant la plongée et des cinétiques de transfert des gaz dissous entre les différents compartiments de l'organisme : depuis les tissus (où ils sont dissous) jusqu'aux poumons (par lesquels ils sont éliminés). Or, pour une même plongée, la quantité de bulles détectées dans la circulation est variable d'une personne à l'autre. Les raisons de cette forte variabilité interindividuelle restent à ce jour méconnues.

A l'échelle de l'individu, cette relation est beaucoup moins nette, suggérant que la présence de bulles circulantes est nécessaire mais ne suffit pas à déclencher un ADD. La capacité des bulles à générer un ADD serait donc dépendante de l'intervention des facteurs individuels, innés ou acquis.

L'objectif de ce projet vise à mieux cerner les mécanismes physiopathologiques de l'ADD. Dans ce but, au cours d'un projet précédent, des rats ont été soumis à des plongées fictives en chambre hyperbare, puis sélectionnés en fonction de leur résistance à l'ADD afin de dégager une lignée spécifiquement résistante à celui-ci. Le taux d'ADD ayant diminué de plus de moitié chez les rats sélectionnés, différentes procédures expérimentales sont maintenant prévues afin de caractériser le phénotype et le génotype commun de ces rats résistants. Dans ce projet, nous nous focaliserons sur la fonction cardiovasculaire en étudiant la régulation de la pression artérielle chez ces animaux.

Toutes ces mesures seront effectuées sous anesthésie et font l'objet de cette saisine.

Ces analyses physiologiques permettront une meilleure compréhension des mécanismes de la résistance à l'ADD. Ce projet a une durée de 12 mois. Il impliquera l'utilisation de 45 rats : 5 rats de la lignée résistante à l'ADD seront utilisés pour la mise au point du protocole (3 mâles et 2 femelles), une fois le protocole optimisé 20 rats (10 mâles et 10 femelles) de la lignée résistante à l'ADD seront ensuite comparés à 20 rats Wistar classiques (10 mâles et 10 femelles) servant de témoins).

Les expérimentations seront réalisées dans le respect de la règle des 3R :

- il s'agit d'une étude des effets au niveau de l'organisme pour laquelle le remplacement n'est pas possible
- le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum permettant une étude statistique cohérente, et en accord avec le principe de réduction
- le raffinement est respecté au niveau des conditions d'hébergement des animaux et au niveau des procédures d'anesthésie/analgésie.

10908 Plus de la moitié des patients souffrant d'un cancer reçoivent un traitement par radiothérapie. Cependant certaines tumeurs cérébrales dont les glioblastomes récidivent dans les champs d'irradiation, principalement suite à une faible réponse des cellules tumorales à la radiothérapie. Identifier les voies moléculaires régissant ces mécanismes de résistance à la radiothérapie permettra de synthétiser des inhibiteurs de ces voies utilisables en clinique humaine pour accroître l'efficacité de cette thérapie. Nous avons identifié dans des cellules de glioblastomes cultivées *in vitro* des protéines impliquées dans les mécanismes de radiorésistance de ces cellules et nous avons fait la preuve de concept *in vitro* que le blocage de ces voies biologiques permet de rendre la radiothérapie plus efficace. Chez le patient les cellules tumorales se développent dans un microenvironnement vascularisé, contenant d'autres types cellulaires, au contact duquel elles se modifient, s'adaptent, migrent. Il est donc indispensable de valider notre preuve de concept dans ce contexte plus global qu'il est impossible de reproduire *in vitro*. Nous envisageons donc d'utiliser un modèle murin très largement utilisé en cancérologie pour valider *in vivo* les études *in vitro*, le modèle de souris immunodéficientes « nude » dans lequel seront implantées (xénogreffes sous-cutanées ou orthotopiques selon les cibles) des cellules tumorales humaines présentant une inactivation des voies d'intérêt. Après irradiation focalisée sur la tumeur, nous nous attendons à observer une diminution ou un blocage de la croissance tumorale beaucoup plus important dans les tumeurs qui seront invalidées pour les cibles d'intérêt. Ces essais pré-cliniques conduiront, au sein de notre équipe spécialisée en recherche translationnelle, à la réalisation d'essais cliniques associant des inhibiteurs de ces voies à la radiothérapie chez des patients porteurs de glioblastome. Sur la base de nos études antérieures et des données de la littérature, nous avons limité le nombre d'animaux à 8 par groupe de traitement. 5 animaux par groupe est le minimum requis pour avoir une significativité statistique. L'hétérogénéité de la prise tumorale, de la croissance des tumeurs chez les animaux et de la réponse à l'irradiation nous oblige à prévoir un nombre plus important d'animaux au départ. Le fait de prévoir des animaux supplémentaires nous épargnera de renouveler plusieurs fois les mêmes expériences. Après une étude de l'inhibition de la cible dans la xénogreffe, quatre groupes sont nécessaires pour valider chacune des cibles préalablement identifiées *in vitro* : groupe contrôle, groupe irradiation, groupe avec inhibition de la cible et groupe irradiation et inhibition de la cible. Les animaux sont hébergés dans des conditions qui répondent à la fois à la réglementation nationale et aux directives européennes dans le domaine de l'expérimentation et de l'éthique animale. De plus, une personne est spécifiquement dédiée au bien-être des animaux. Afin de réduire au maximum le stress des animaux, ils seront manipulés avec précautions et calme durant toute la durée de l'expérience. Les animaux seront observés tous les 2 jours afin de repérer précocement les signes neurologiques (xénogreffes orthotopiques) ou de souffrance (xénogreffes sous cutanées). Les animaux seront mis à mort dès l'apparition de signes neurologiques ou de souffrance par surdosage anesthésique. Toutes les manipulations qui pourront être stressantes ou douloureuses pour l'animal seront réalisées après anesthésie (implantation des tumeurs, irradiation des animaux). Ce projet sera réalisé sur 5 ans, soit un nombre total d'animaux de 700 souris au maximum, afin de valider jusqu'à 10 cibles identifiées et pour obtenir des valeurs d'efficacité

statistiques permettant un développement clinique ultérieur. Ce projet a d'ores-et-déjà été appuyé par différents comités scientifiques nationaux

10909 Le surpoids et l'obésité concernent plus de la moitié de la population française. L'obésité est le plus souvent accompagnée de nombreux dysfonctionnements dans l'organisme augmentant le risque de complications cardio-vasculaires et de diabète de type 2. A la ménopause, l'incidence des risques cardio-vasculaires augmente pour rejoindre celle observée chez les hommes. En effet, les oestrogènes exercent un effet protecteur sur le système cardiovasculaire mais également musculaire et osseux. Ainsi, la ménopause est une période délicate pour la femme entraînant le plus souvent une prise de poids associée à une augmentation des risques cardio-vasculaires, mais également une diminution de la qualité musculaire et osseuse pouvant entraîner une fragilité musculo-squelettique.

La mise en place d'un déficit énergétique au travers d'une ration alimentaire réduite est efficace pour la perte pondérale mais reste difficile à maintenir à long terme. De plus si une perte de poids de 10% permet d'améliorer la santé métabolique, elle entraîne néanmoins une perte de masse maigre dont 1 à 2% de la masse osseuse au niveau du corps entier. L'activité physique est une stratégie de prise en charge permettant d'induire un déficit énergétique, elle représente un moyen efficace pour modifier la composition corporelle et améliorer le métabolisme en agissant à la fois sur les tissus adipeux, musculaire et osseux.

La réalisation de ce projet permet de répondre à des questions scientifiques s'inscrivant dans des problèmes de santé publique majeurs. L'objectif est d'évaluer les effets métaboliques et musculo-squelettiques des méthodes de prévention secondaires et tertiaires dans le cadre de l'obésité associée au déficit en oestrogènes.

Le projet présenté vise à objectiver les effets des différentes stratégies d'intervention, impliquant notamment des stratégies d'adaptation nutritionnelles et d'activité physique, d'une part :

-sur les différents marqueurs biologiques tels que la glycémie et la tolérance aux glucides d'autre part :

-sur le statut musculo-squelettique au travers de marqueurs du remodelage musculaire et osseux

Ce projet envisage d'étudier ces différents effets chez la souris C57BL/6J ovariectomisée/ou non, rendue obèse suite à un régime riche en gras.

La mise en régime pour induire une obésité durera 12 semaines puis sera suivie de 8 semaines de prise en charge.

L'objectif à terme, sera d'optimiser les méthodes de prévention secondaires et tertiaires des risques métaboliques et de la dégradation musculo-squelettique chez la femme ménopausée en surcharge pondérale.

Ce projet nécessitera un minimum de 12 groupes de 15 souris (180 souris) permettant d'évaluer les effets :

1-d'une complémentation en D-Sérine sur le taux de céramides circulants et tissulaires ainsi que la glycémie et la tolérance au glucose chez des souris rendues obèses suite à un régime riche en gras et en fructose

2- de deux stratégies de déficit énergétique sur le taux de céramides circulants et tissulaires, la glycémie et la tolérance au glucose ainsi que les réponses métaboliques et musculo-squelettiques

3- du statut hormonal (ovariectomisées vs non-ovariectomisées) sur les réponses métaboliques et musculo-squelettiques des interventions présentées dans les deux points précédents

La règle des 3R est respectée dans ce projet, en effet :

-Les procédures réalisées sur les animaux (pesée, composition corporelle, test de tolérance aux glucides) sont pour la plupart non invasives et réalisées sans anesthésie car elles n'engendrent qu'un état de stress minimal. Les deux procédures modérées, seront, l'ovariectomie et la mise en cage individuelle des animaux permettant l'évaluation de la prise alimentaire à différents temps du protocole.

-Le modèle de souris C57BL6/J est particulièrement adapté pour répondre à des régimes induisant une obésité. Le recours à un modèle *in vitro* n'est pas souhaitable car les modèles cellulaires de mimétisme de l'obésité ou de la carence en oestrogènes sont peu représentatifs du fonctionnement *in vivo*.

-Une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur chez l'animal, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole.

10910 L'insuffisance cardiaque est une maladie grave qui se définit par l'incapacité du cœur à pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins de l'organisme. Elle survient généralement chez des individus majoritairement âgés dont la santé est fragilisée depuis plusieurs années par des troubles cardiaques ou respiratoires ou par de l'hypertension. Elle se présente par un essoufflement et une fatigue disproportionnés par rapport à l'effort produit, d'abord uniquement à l'effort, puis aussi au repos. Dans les cas les plus avancés apparaissent dyspnée, toux nocturne, œdème (des poumons, des membres inférieurs), ascite, cardiomégalie. Le nombre de cas d'insuffisance cardiaque a augmenté au cours des 30 dernières années. Parmi les raisons de cette augmentation, il y a l'amélioration des traitements des troubles cardiaques avec le prolongement de l'espérance de vie des personnes atteintes. L'insuffisance cardiaque est une cause importante de mortalité chez les personnes âgées, et le taux de survie 5 ans après le diagnostic est d'environ 50%, avec au moins 165000 hospitalisations et plus de 70000 décès chaque année en France.

C'est pourquoi nous souhaitons étudier l'insuffisance cardiaque (plus particulièrement de type à fonction systolique conservée) avec un modèle de porc à pression artérielle et fréquence cardiaque élevées, car nous avons grand besoin de comprendre sa physiopathologie et de trouver de nouvelles stratégies visant à prévenir ou à réduire la progression du dysfonctionnement du cœur. Notre projet prévoit d'utiliser au maximum 60 porcs sur 5 ans. La fréquence cardiaque, la taille du cœur, l'anatomie coronaire, l'innervation, la circulation collatérale native du porc sont très proches de celle de l'Homme. Le plan général du projet est de pratiquer une chirurgie afin d'implanter des sondes de mesure de l'activité cardiaque (pression aortique et ventriculaire gauche, dimensions du muscle et de la cavité cardiaque) et un câble de stimulation de pacemaker, et après une période de repos, d'induire une insuffisance cardiaque afin d'évaluer l'effet d'un traitement thérapeutique grâce aux sondes implantées, mais aussi grâce à des mesures écho-cardiographiques et à l'analyse de sang et de tissus cardiaques prélevés. Le premier traitement prévu est une thérapie cellulaire basée sur les cellules dérivées des cardiosphères. D'autres traitements pourront être testés par la suite.

Seule l'utilisation d'animaux permet d'atteindre l'objectif du projet, qui vient en complément des autres méthodes alternatives et doit rester proche de la réalité clinique humaine pour rester scientifiquement valable. Nous prévoyons d'utiliser le minimum d'animaux en contrôlant leur nombre par les méthodes statistiques. L'anesthésie et l'analgésie seront adaptées afin de n'induire aucune souffrance, et des vétérinaires contrôleront régulièrement l'état de santé des animaux. Ils seront hébergés selon les normes en cours, et nous veillerons à la bonne qualité des soins et à leur bien-être pendant toute l'expérimentation.

10911 L'effet de l'exposition à des pesticides est une préoccupation sociétale majeure. De nombreux mécanismes d'action contribuent à l'effet néfaste de ces substances sur la santé au premier rang desquels on trouve les perturbateurs endocriniens. Une des cibles privilégiées de telles substances est le fœtus exposé à travers la contamination de sa mère. Ce projet s'intéresse plus particulièrement aux effets des pesticides sur la fonction thyroïdienne materno-fœtale et à leurs conséquences sur le développement du système nerveux central. Les interactions mères fœtus sont extrêmement complexes et à ce jour aucune méthode alternative ne permet de les appréhender de façon correcte. Cette étude sera réalisée sur un modèle ovin pertinent par rapport à l'humain en termes de physiologies thyroïdienne et fœtale. Un total de 73 animaux (25 brebis adultes et 48 fœtus) seront nécessaires pour cette étude. Une brebis sera utilisée dans une étude préliminaire afin d'optimiser le schéma d'exposition des brebis gestantes et éviter tout écueil de nature à invalider l'étude suivante et lié à la complexité du mélange administré. Cette étude vise à

confirmer l'absence de toxicité aiguë du mélange et l'efficacité de la voie d'administration choisie, préférentiellement la voie orale représentative de l'exposition aux pesticides. Les réponses attendues sont du type oui/non, il a donc été estimé qu'un seul animal suffisait. Puis 24 brebis à 30 jours de gestation, de race Romane, seront réparties en deux lots. Un lot recevra un mélange de six pesticides très utilisés en arboriculture et fréquemment rencontrés sur des échantillons de pomme. Les pesticides seront administrés à la « dose journalière admissible » définie réglementairement comme sans danger pour la santé (faible dose qui représente 1/100ème de la plus forte dose n'ayant montré aucun effet chez l'animal dans des investigations toxicologiques réglementaires). Le deuxième lot sera exposé aux adjuvants (contrôles négatifs). Les brebis gestantes seront hébergées en bergerie dans le respect de leur mode de vie grégaire sur une surface suffisante pour permettre l'expression de leur comportement social, avec un libre accès à la nourriture (foin) *ad libitum* et l'ensemble des manipulations sera réalisé dans des conditions propres à limiter les stress d'isolement. Les animaux seront observés tous les jours durant la distribution du granulé pour détecter tout signe de stress (isolement du groupe, comportement de fuite exacerbé...) afin de détecter tout signe de maladie (anorexie, position self-auscultation, grincement de dents, diarrhée, hyperthermie, toux, asthénie...) permettant ainsi une intervention précoce (ajustement des conditions expérimentales ou visite vétérinaire). La fonction thyroïdienne des mères sera suivie pendant toute la gestation. Tous les fœtus à terme (estimé à 48 selon la prolificité des mères) seront extraits après euthanasie des brebis afin d'éviter les grandes modifications physiologiques liées à la mise-bas. Des prélèvements de sang de cordon et de sang jugulaire seront alors réalisés pour la mesure des taux d'hormones. Les marqueurs thyroïdiens et des biomarqueurs fins du développement dans différents organes collectés postmortem, en particulier le cerveau, seront analysés par des méthodes globales sans hypothèse a priori (« OMICs »). Cette approche permettra d'identifier des cibles potentielles des pesticides et/ou des modifications thyroïdiennes sur le développement du cerveau. Cette méthodologie conduit à l'obtention d'un très grand nombre de données sur un même animal permettant ainsi de générer et d'explorer plusieurs hypothèses dans une seule et même étude. Ce type de méthode requiert des approches statistiques complexes qui sont d'autant plus performantes que l'effectif est grand. Bien que 8 animaux puissent suffire pour des modifications de grande amplitude, un effectif de 10-12 fœtus, par groupe et par sexe, soit 40-48 fœtus au total, permettra d'améliorer la puissance statistique des tests et augmenter les chances de pouvoir identifier des modifications plus subtiles. Le taux de prolificité moyen de la race romane (2 fœtus /brebis gestante) permettra d'obtenir approximativement 48 fœtus permettant ainsi de faire face aux variations biologiques possibles dans la prolificité des brebis et/ou du sex-ratio et de maintenir dans chaque sous-groupe (traitement x sexe) un effectif minimum de 10 fœtus. Ce projet, devrait permettre, dans un modèle pertinent par rapport à l'homme, d'évaluer des effets potentiels sur le développement du cerveau en lien avec la fonction thyroïdienne d'un mélange réaliste de pesticides, à des doses réglementaires réputées sans danger.

10912 Les maladies inflammatoires de l'intestin et notamment les colites inflammatoires sont des pathologies aux incidences élevées et croissantes dans les pays industrialisés. Ces pathologies surviennent lors de perturbations de la flore intestinale qui conduit à une réponse immunitaire inflammatoire incontrôlée qui attaque de façon chronique les tissus intestinaux. Il est maintenant possible de « corriger » une flore intestinale déséquilibrée par l'administration de prébiotiques (fibres alimentaires non digestibles par l'Homme, et servant de nutriment aux bonnes bactéries de l'intestin, permettant leur développement au détriment des mauvaises bactéries) ou à l'aide de probiotiques (apport de bactéries bénéfiques via l'alimentation ou supplémentées sous forme lyophilisée en gélules). Notre but est d'évaluer la capacité de 2 prébiotiques et de 5 probiotiques sélectionnés pour leur pouvoir anti-inflammatoire à prévenir ou traiter une colite inflammatoire. Cette étude nécessite l'utilisation d'un modèle de colite inflammatoire aiguë induite chez la souris, afin de vérifier l'impact d'une amélioration de la flore sur l'induction ou le traitement de la colite. Nous comparerons des souris contrôles à des souris ayant reçus du pré ou du probiotique. Nous évaluerons l'effet de ces traitements en prophylaxie (avant d'induire la colite) et vérifierons leur capacité à amoindrir voire prévenir le développement de la pathologie. Ces résultats permettront de

proposer des interventions nutritionnelles afin de participer à la prévention de l'apparition de ces pathologies inflammatoires de l'intestin, et potentiellement de les proposer en tant que traitement pour des patients souffrant déjà de ces troubles. Ce projet nécessite l'utilisation de 150 souris. Il a été conçu dans le respect de la règle des 3 Rs. En effet, nous en sommes à une étape où les modèles animaux ne peuvent être Remplacés par des expériences *in vitro* ; nous avons Réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats fiables et enfin, en termes de Raffinement, les souris seront maintenues dans des cages de 6, avec un environnement enrichi. Les procédures expérimentales ne nécessitent pas d'anesthésies ni d'analgésies. Les animaux seront surveillés et pesés chaque jour à compter de l'induction de la colite inflammatoire (par agent chimique contenu dans de l'eau de boisson). Nous avons également établi une grille précise de « points limites » permettant de déclencher l'ajout d'un analgésique si besoin. Dans ce cas-là, les animaux seront surveillé plusieurs fois par jour durant 24h. Si aucun signe d'amélioration n'est noté sous 24h, les animaux seront sortis de l'étude afin d'éviter le maintien de tout animal présentant un quelconque signe de souffrance.

10913 La mandibule comme par exemple la calvaria est un os de membrane dont la cicatrisation est différente des os longs et des os courts. La mise en place de prothèses dentaires nécessite une structure osseuse de qualité et en quantité suffisante, ce qui n'est souvent pas le cas. Il est donc nécessaire dans un premier temps d'augmenter la hauteur de la mandibule et/ou améliorer la qualité osseuse de l'os persistant. Il est possible, dans ces indications, d'utiliser des autogreffes, des allogreffes voire des xéno-greffes. Toutefois, le volume de l'autogreffe est limité et il a été montré que le site de prélèvement est à l'origine chez un certain nombre de patients de douleurs importantes pouvant persister pendant plusieurs mois (11% à 1 an). Pour les allogreffes et les xéno-greffes, le problème de la stérilisation sans dénaturer la structure osseuse est primordial pour éviter la transmission de maladies et n'est toujours pas parfaitement résolu. C'est pourquoi, l'utilisation des biomatériaux de synthèse est une voie de développement.

Les biomatériaux que nous étudions font toujours l'objet d'études *in vitro* en préalable des études *in vivo*. Ces études *in vitro* permettent d'éliminer certains biomatériaux en raison d'effets délétères. Néanmoins, une étude *in vivo* est nécessaire avant l'utilisation en chirurgie humaine afin d'apprécier les effets et les interactions sur un organisme vivant. Il s'agit d'ailleurs d'une recommandation de la norme ISO 10993-6 lors du marquage CE. Le Lapin, les petits ruminants et le Chien sont les espèces les plus utilisés dans ces modèles *in vivo*.

Ces modèles animaux correspondent donc à des modèles que nous réalisons depuis des années et plusieurs fois par an afin d'étudier :

- * un nouveau biomatériau (face à un matériau de référence),
- * l'adjonction de principe actif ou de cellules à un biomatériau connu afin d'améliorer sa bioactivité,
- * l'effet d'un traitement par voie parentérale concomitant à ces implantations...

L'application de la règle des 3R sera effectuée comme suit :

Les biomatériaux implantés font l'objet d'une étude préalable *in vitro* avant d'être implantés chez l'animal afin de réaliser une première sélection.

Le nombre d'animaux est réduit au maximum grâce à l'utilisation de statistiques non paramétriques et en veillant à réduire la variabilité.

La réalisation des interventions par des chirurgiens vétérinaires expérimentés permet de réduire le traumatisme chirurgical. Outre la gestion de l'analgésie pré et postopératoire, l'état général et clinique des animaux est surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier et par un vétérinaire pour estimer une éventuelle gêne ou douleur. Cette évaluation journalière permet la mise en place, si nécessaire, d'un traitement le plus précocement possible. Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu.

Les tests statistiques non paramétriques permettent de travailler sur des effectifs faibles et ainsi de réduire le nombre de lapins utilisés.

Sur la période de 5 ans, 60 lapins seront utilisés.

10914 Les troubles anxieux généralisés sont associés à des perturbations de la transmission dopaminergique. Certains symptômes, parmi lesquels une exacerbation des réponses émotionnelles associées à des stimuli aversifs (réponse de peur), résultent en partie d'un dysfonctionnement des circuits neuronaux contrôlés par la dopamine au niveau du noyau paraventriculaire du thalamus (PVT).

Ce projet a pour objectif de caractériser les neurones cibles de la dopamine (c'est à dire exprimant les récepteurs dopaminergiques) dans le PVT et de préciser le rôle fonctionnel de ces récepteurs dans le contrôle des réponses émotionnelles.

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

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

Réduire : Cette étude anatomo-fonctionnelle s'articulera autour de 3 objectifs qui impliqueront 4 procédures expérimentales (classes légères à modérées).

Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude est de 410 sur une période de 3 ans. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité statistique des expériences qui seront menées. Seules les expériences considérées comme absolument indispensables seront réalisées. Dans le but d'une exploitation maximale des données obtenues, plusieurs régions cérébrales seront systématiquement analysées.

Raffiner : Toutes les souris seront utilisées de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales. Les animaux seront hébergés en groupe dans des environnements enrichis (nids végétaux.). Afin de diminuer le stress, les souris seront manipulées quotidiennement par les expérimentateurs avant chaque procédure expérimentale. Ce projet implique de la neurochirurgie qui sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance sont détectés.

Remplacer : Le projet reposant l'établissement de liens de causalité entre l'identité moléculaire et cellulaire des neurones dopaminocetifs et le contrôle des réponses émotionnelles, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par des méthodes alternatives.

10915 Les astrocytes sont des cellules gliales présentes en grand nombre dans le cerveau qui constituent le troisième élément de la synapse, à l'interface entre deux neurones. Ils fournissent les substrats énergétiques (tel que le glucose) aux neurones et permettent la recapture des neurotransmetteurs à la synapse. De plus, il a été mis en évidence que les astrocytes sont impliqués dans le traitement des informations cérébrales en modulant l'excitabilité neuronale. Les connexines 30 (Cx30) et 43 (Cx43) sont des protéines membranaires exprimées spécifiquement au niveau astrocytaire. Elles peuvent jouer plusieurs rôles : s'aligner aux connexines des cellules adjacentes afin de former des jonctions communicantes, réguler la taille du réseau astrocytaire ou encore la transmission synaptique. De par leurs propriétés les astrocytes joueraient donc un rôle crucial dans la régulation de la transmission neuronale. Chaque astrocyte peut en effet influencer des milliers de synapses simultanément. Cette grande connexion entre les circuits neuronaux et astrogliaux suggère une forte corrélation entre l'organisation du réseau astrocytaire et la fonction neuronale. Les astrocytes ont été montré comme modulant l'activité neuronale. Certains psychotropes, en phase d'essais cliniques, ont été démontrés comme agissant sur l'activité neuronale d'une part et sur le réseau astrocytaires d'autre part. Ainsi, en modulant le couplage astrocytaire il est possible de potentialiser l'effet d'un psychotrope sur l'activité neuronale et donc d'en réduire les posologies. Ainsi il sera possible d'avoir une molécule plus efficace, en en réduisant les doses administrées aux patients. Afin d'optimiser les posologies nous allons déterminer l'influence de la taille du réseau astrocytaire sur l'activité neuronale.

Dans cet objectif les souris subiront une chirurgie sous anesthésie générale supplémentée d'un analgésique : injection intra-crânienne de vecteur viral par stéréotaxie. Puis 10 jours après l'injection les souris seront euthanasiées dans l'objectif de prélever les cerveaux en vue d'analyses électrophysiologiques, et de dosages protéiques.

Ainsi, nous utiliserons des souris où nous modulerons les taux de connexines (inhibition, surexpression) afin de pouvoir étudier leurs influences sur les activités neuronales. Nous établirons une corrélation entre les taux de connexines et la taille des réseaux astrocytaires et testerons les activités neuronales associées.

La réalisation de ce projet nécessitera 777 animaux.

Ce projet respecte les principes énoncés par les 3R (remplacement, réduction, raffinement). Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible et correspond au minimum nécessaire pour obtenir des résultats scientifiques significatifs. Il n'existe pas non plus d'autres modèles permettant de répondre à nos questions biologiques. En effet nous ne possédons pas les outils génétiques, physiologiques permettant cette étude sur un autre modèle. De plus dans des études complémentaires ayant été effectuées sur la souris, il est plus juste d'utiliser ce même modèle afin d'établir des comparaisons et de les compléter. Enfin, comme il s'agit d'une étude physiologique sur l'activité des cellules il est impossible d'étudier ceci sur un modèle *in vitro*, car notre étude nécessite forcément d'étudier les phénomènes d'intérêt dans l'organe d'origine.

Chaque animal fera l'objet d'une surveillance accrue pendant la procédure et les jours suivants. Enfin, nos souris sont hébergées en groupe dans un milieu enrichi. Toutes les précautions sont assurées afin de respecter au mieux le bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement pour surveiller leur comportement. Pour tous les animaux un suivi régulier de leur alimentation, une présence de plaie ou si l'animal se gratte. Un suivi en plus sera réalisé pour les animaux après chirurgie, afin de vérifier en plus la cicatrisation de la plaie.

10916 Le carcinome rhinopharyngé (NPC pour Nasopharyngeal Carcinoma) est un cancer de la cavité rétronasale qui s'observe principalement dans deux groupes de population : 1) les grands enfants et les adolescents entre 10 et 20 ans et 2) les adultes de la cinquantaine. Il s'agit d'une tumeur agressive susceptible d'envahir la boîte crânienne à travers les os de la base du crâne ou encore de donner des métastases à distance dans les os, le poumon et le foie. Cependant les NPC sont radiosensibles et chimiosensibles et la guérison est obtenue dans environ 80 % des cas. Toutefois cette guérison a souvent un prix élevé pour le patient avec des séquelles non négligeables, en particulier une insuffisance des glandes salivaires (entraînant une bouche sèche permanente) et, chez l'enfant et l'adolescent, des anomalies de croissance osseuse en zone irradiée, aboutissant à des distorsions du massif facial. D'où l'intérêt de thérapies complémentaires basées sur une activation anti-tumorale du système immunitaire. Une approche prometteuse a consisté à mettre en place un traitement d'entretien de 6 mois à base d'interféron- β (IFN β), permettant à la fois de réduire les doses de radiothérapie et de chimiothérapie et d'augmenter le pourcentage de guérisons.

Notre projet scientifique qui regroupe des biologistes et des oncopédiatres de plusieurs pays européens vise à mieux comprendre le mécanisme d'action de l'IFN β chez les sujets porteurs de NPC de façon à aller plus loin dans l'efficacité thérapeutique. Nous pensons que l'IFN β exerce en grande partie son action par l'intermédiaire des cellules NK. Il s'agit d'une catégorie de cellules sanguines qui jouent un rôle important dans l'immunité anti-infectieuse et anti-tumorale. Nous avons pu montrer *in vitro* que l'IFN β rend les cellules NK plus efficaces pour tuer les cellules malignes de NPC. D'où l'idée d'injecter des cellules NK amplifiées *in vitro*, en même temps que l'IFN β pour qu'elles viennent en renfort des cellules NK déjà présentes dans l'organisme et ainsi favorisent l'effet anti-tumoral. Toutefois, pour proposer cette modalité thérapeutique aux adolescents porteurs de NPC, il faut un degré de certitude supplémentaire qui ne peut être obtenu par les seules expériences *in vitro*. En effet, le comportement des cellules *in vitro* ne reflète que partiellement celui des cellules *in vivo*. Par exemple, *in vitro*, les cellules tumorales se développent sous forme de monocouche en 2 dimensions, tandis qu'*in vivo*, elles se développent en trois dimensions, réagissant différemment à l'attaque des cellules NK. Il nous faut donc examiner l'effet de cellules NK prétraitées ou non avec de l'IFN β sur la croissance de tumeurs NPC greffées chez la souris. De

plus, l'étude de l'impact potentiellement bénéfique de l'IFN-beta dans les NPC dépend du microenvironnement tumoral, et des interactions humorales et immunitaires avec le reste de l'organisme. Il est donc indispensable de recourir à des animaux vivants pour parvenir à valider ou non cette hypothèse.

Ces expériences sont une étape indispensable avant de pouvoir proposer des traitements combinant l'IFN β avec l'injection de cellules NK. Ceci afin d'avoir le maximum d'assurance d'atteindre une efficacité anti-tumorale au moins équivalente à celle des traitements actuels avec des séquelles en moins. Ces expériences *in vivo* représentent un défi dans la mesure où il faut optimiser les modalités de greffe tumorale et les modalités de préparation et d'injection des cellules NK. Heureusement pour éviter des mises au point longues et laborieuses et réduire le nombre d'animaux utilisés nous combinons les savoir-faire de plusieurs équipes. Les unes ayant une longue habitude du modèle tumoral utilisé et les autres ayant une bonne expérience du traitement par l'IFNbeta et par les cellules NK. En outre, le maximum de mises au point et d'expériences préliminaires ont été effectuées au préalable *in vitro*. Nous prévoyons d'utiliser au maximum 135 souris pour ce projet. Ce nombre a été déterminé comme le nombre suffisant pour valider ou non l'hypothèse principale du projet. Si l'hypothèse est validée ou invalidée avant, moins d'animaux seront utilisés.

La procédure expérimentale comporte comme contrainte principale pour les animaux l'injection de petites tumeurs par voie sous-cutanée puis des injections dans ces tumeurs. Tous ces gestes seront réalisés sous anesthésie générale (greffe tumorale, injection intratumorale). En dehors de ces étapes sous anesthésie, l'inconfort des animaux sera atténué grâce à une surveillance stricte, une limitation des tailles de tumeurs et des dispositifs d'enrichissement placés dans les cages. A noter que les greffes tumorales seront réalisées de manière à réduire l'inconfort et la douleur suivant un protocole qui permet le maintien de la lésion dans les plans sous-cutanés sans infiltration des organes sous-jacents. Dans les conditions standards de greffe et de taille de tumeur, ces contraintes sont minimales pour la vie des animaux pendant la procédure.

10917 Au début des années 80, suite au développement exponentiel de l'aquaculture en Norvège pour l'élevage intensif de saumon, des antibiothérapies ont été mises en place. Cependant, cette stratégie pour lutter contre l'apparition et le développement des maladies infectieuses et parasitaires a rapidement montré ses limites. En effet, (1) l'efficacité des antibiotiques n'est pas garantie de façon systématique, (2) le coût des traitements est élevé puisqu'ils sont administrés de manière très fréquente et le plus souvent non ciblée, (3) l'impact écologique est potentiellement important, puisque ces antibiotiques ou leurs résidus sont retrouvés dans l'environnement et conduisent à une diminution de la flore sédimentaire, ainsi qu'à la sélection et la résistance des bactéries. (4) Par ailleurs, les résidus d'antibiotiques retrouvés dans la chair de poissons constituent un risque non négligeable pour la santé du consommateur puisqu'ils peuvent conduire encore une fois à l'installation d'une résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes pour l'Homme. Ainsi, depuis la fin des années 80, la vaccination en aquaculture s'est fortement développée. En effet, les études entreprises au cours de ces dernières décennies ont montré que les poissons possèdent un système immunitaire (immunités innée et acquise) comparable à celui des vertébrés supérieurs, mammifères notamment, et sont donc capables d'élaborer des défenses vis-à-vis des bioagresseurs (virus, bactéries et parasites).

Différents types de vaccins existent aujourd'hui comme les traditionnels vaccins inactivés et atténués ou sont en cours de développement et notamment les vaccins recombinants, sous-unitaires, vectorisés, peptidiques, à ADN et les nanovaccins. Alors que les vaccins à ADN ont montré leur efficacité, ils présentent un risque d'intégration génomique et de propagation du caractère OGM aux populations sauvages qui freine leur développement. De plus, leur mode d'administration par voie intramusculaire est contraignant et non applicable aux alevins.

En réponse à cela, ce projet contribuera à développer des nanovaccins à ARNm. Plus précisément, ce projet identifiera des formulations et des modes d'administration vaccinale efficaces. Pour cela nous utiliserons des ARNm modifiés, et donc stables, codant pour des protéines fluorescentes. Ainsi, nous serons capables de suivre la bonne incorporation de l'ARNm et son expression dans la

cellule. Le modèle utilisé est le poisson zèbre. Les lignées employées sont des lignées dites "Casper" : elles sont dépourvues de pigmentation et donc optiquement transparentes aux stades précoces de développement. Ces lignées "Casper" seront utilisées ainsi que des lignées "Casper" croisées avec des lignées transgéniques pour lesquelles différentes cellules du système immunitaire sont fluorescentes. Ainsi, nous serons capables de déterminer si la protéine fluorescente codée par l'ARNm administré s'exprime et dans quelle cellule immunitaire. Les poissons seront étudiés à différents stades (juvéniles et adultes) et les composés d'intérêt leur seront administrés, soit par injection intra-musculaire ou intra-péritonéale, soit par balnéation ou pulvérisation cutano-muqueuse sous anesthésie.

Ce projet fait suite à un précédent projet déposé et accepté en Janvier 2017. Celui-ci nous a permis de montrer que les résultats qui étaient préalablement établis *in vitro* sur des lignées de cellules de poissons étaient difficilement transposables *in vivo*. Cependant, des études préliminaires réalisées sur des œufs fertilisés (n'entrant pas dans la législation avant 5 jours de développement) ont montré leur efficacité pour sélectionner le meilleur ARNm modifié et sa concentration optimale permettant une expression détectable de la protéine fluorescente ; ceci contribue au respect de la première règle des 3R : réduction. Cette étude s'inscrit dans un plus large projet visant à développer un vaccin à ARN pour les poissons d'élevage et est donc nécessaire pour éviter de tester les différentes formulations et voies d'administration sur la truite (remplacement).

Le nombre maximum d'animaux utilisés dans les procédures expérimentales est de 3174 poissons zèbres. Il a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les procédures décrites sont évaluées à un niveau de classe légère. Les conditions optimales d'hébergement sont respectées (animaux maintenus en banc et nourris tous les jours de manière adaptée à l'âge du poisson) et les points limites sont fixés afin de réduire la souffrance des animaux (absence de signes généraux évocateurs de mal-être (animal prostré au fond du bac, qui ne bouge pas, ne mange pas ou a du mal à se déplacer, nageoires abîmées, animal courbé ou présentant une modification de sa couleur) (raffinement).

10918 Les avancées récentes dans notre compréhension de la régulation des fonctions des cellules immunitaires ont permis l'émergence de nouvelles immunothérapies anti-tumorales. Ainsi, plusieurs thérapies fondées sur l'utilisation d'anticorps ont montré un bénéfice clinique dans plusieurs cancers, notamment dans le cancer du poumon et le cancer de la peau. Néanmoins, bien que ces traitements aient permis d'améliorer la survie de certains patients, le taux de réponse reste limité du fait du développement de mécanismes divers par la tumeur pour inhiber les fonctions immunitaires. L'objectif de ce projet consiste à améliorer notre compréhension de certaines cellules immunitaires infiltrant les tumeurs ayant une activité anti-tumorale particulière. Notre programme vise à long terme à potentialiser les immunothérapies anti-cancéreuses actuelles en optimisant le recrutement des globules blancs dans les tumeurs et en dopant leurs fonctions cytotoxiques afin d'éliminer toutes les cellules tumorales.

Du fait de leur rôle stratégique au sein de l'immunité dans les modèles infectieux, les cellules T mémoires peuvent être un facteur clé du modèle tumoral. En effet, certaines études montrent que des cellules immunitaires résidentes dans les tissus pourraient retarder la croissance tumorale. Il est donc crucial d'améliorer notre compréhension de leur développement, de leur recrutement au niveau tumorale ainsi que de leur diversité clonale. Ce projet représente un enjeu considérable pour le développement d'approches d'immunothérapies visant à éradiquer la tumeur.

L'utilisation d'animaux vivants est indispensable pour ce projet de façon à permettre d'étudier les interactions immunitaires et l'impact de la vaccination sur le recrutement et la diversité des cellules immunitaires résidentes dans un microenvironnement tumoral complexe. La souris, qui a un système immunitaire proche de celui de l'Homme, est le seul modèle qui nous permet d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires agissant sur les tumeurs.

Nous prévoyons dans un premier temps, de comparer l'impact du type tumoral sur le schéma de différenciation des cellules T mémoires résidentes dans les tissus tumoraux cutanés ou pulmonaires. Dans un second temps, nous prévoyons de comparer l'impact d'une vaccination

peptidique sur le schéma de différenciation des cellules T mémoires résidentes dans les tissus tumoraux cutanés.

Afin de pouvoir étudier le développement des cellules T mémoires résidentes dans les tissus tumoraux, nous utiliserons la technologie du « barcoding » ou code-barres génétiques qui permet d'identifier le progéniteur de chacune des cellules isolées au sein de la tumeur, de la rate et des ganglions lymphatiques drainant la tumeur. En effet, les cellules T ayant intégrées le code-barres génétique au sein de leur génome vont être capable de le transmettre à chacune de leurs cellules filles. Cela nous permettra de définir un schéma de développement et de différenciation de cette sous-population de cellules T et de comparer leur diversité avec les autres sous-types de cellules T.

Afin de pouvoir étudier les cellules T infiltrant les tumeurs, nous utiliserons des souris transgénique ret développant spontanément des tumeurs cutanées ou des souris standards injectées en sous-cutanée avec des cellules des lignées tumorales cutanées ou pulmonaires. Ces souris recevront alors ou non un vaccin anti-tumoral administré par voie sous-cutanée. Lorsque les procédures sont terminées, les cellules T présentes au sein de la tumeur, de la rate et des ganglions lymphatiques drainant la tumeur seront analysées.

Pour cela nous utiliserons au maximum 396 souris sur 5 ans. Les expérimentations *in vivo* seront réalisées toutes les 7 semaines pour nous permettre d'analyser les résultats et de modifier le protocole suivant les résultats précédents obtenu *in vivo* afin de réduire le nombre d'expérience, et donc le nombre d'animaux utilisés. Les souris seront suivies continuellement pour vérifier leur bien-être, suivant les règles en vigueur de l'animalerie. Toutes les procédures seront faites sous anesthésie locale ou générale avec analgésie quand l'état des animaux le nécessite et systématiquement en cas de chirurgie. Des soins spécifiques ainsi que l'adaptation de l'alimentation des animaux seront aussi pratiqués en cas de nécessité.

10919 La méningite cérébro-spinale et le purpura fulminans sont des infections bactériennes sévères et d'évolution rapide, dont la mortalité approche 100 % en l'absence de prise en charge médicale. En France, le taux de mortalité reste élevé à 8 % des cas (3 % dans la méningite et 30 % dans le purpura fulminans) malgré l'existence de traitements. De plus, même en cas d'évolution non fatale, les séquelles sont fréquentes et graves (amputations). La bactérie responsable de ces infections à la particularité de coloniser les vaisseaux sanguins lorsqu'elle provoque une infection invasive. Nous savons aujourd'hui que cette étape est essentielle dans le cycle infectieux de cette bactérie. De plus la bactérie responsable de ces infections n'interagit qu'avec les vaisseaux sanguins humains. L'étude de cette bactérie *in vivo* requiert donc l'utilisation d'un modèle de souris humanisées.

Le but de notre projet est de mieux comprendre les mécanismes de virulence de la bactérie en recherchant les facteurs essentiels à sa survie lors de la phase sanguine.

Par l'utilisation d'un modèle animal, nous validerons le rôle des facteurs de virulence permettant à cette bactérie la survie et la croissance dans le sang puis lors de la colonisation des vaisseaux sanguins, facteur clé lors de l'infection.

Dans un premier temps les souris seront infectées avec la bactérie, et nous analyserons l'évolution de la bactériémie en réalisant des prélèvements sanguins. 18 heures après l'infection, les souris seront euthanasiées.

Ensuite, l'étude de l'interaction avec les vaisseaux sanguins humains nécessite l'utilisation d'une lignée de souris humanisées. Les souris seront greffées avec de la peau humaine. Après la prise de greffe, elles seront infectées avec la bactérie, et nous analyserons l'évolution de la bactériémie en réalisant des prélèvements sanguins. Dix-huit heures après l'infection, les souris seront euthanasiées pour prélever le greffon et étudier la colonisation et les lésions tissulaires. Ce projet nécessitera l'utilisation de 690 souris.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant de répondre aux questions scientifiques de ce projet, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours

d'expériences précédentes. Les animaux bénéficieront d'une surveillance quotidienne durant les procédures expérimentales et les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale. Afin de réduire leur souffrance et leur stress, des mesures antalgiques médicamenteuses sont prévues pour toutes les procédures douloureuses et une surveillance quotidienne sera réalisée. Enfin, des points limites ont été établis. Ils entraîneront la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire, pour limiter la souffrance.

10920 Le choc septique est stade le plus grave d'une infection. Il constitue un motif fréquent d'admission en réanimation (environ 70 000 par an en France) et il est responsable chaque année de nombreux décès du fait d'une mortalité importante (de l'ordre de 40% chez les patients en choc septique) malgré une prise en charge optimale. Les raisons pour lesquelles une bactérie peut être responsable d'une infection contrôlée ou d'un choc septique fatal ne sont pas encore complètement comprises. Une recherche scientifique est donc nécessaire pour mieux comprendre la physiopathologie du choc septique, afin de trouver de nouveaux marqueurs diagnostiques et de nouveaux traitements.

Cependant, de plus en plus de travaux s'intéressent aux complications faisant suites à un choc septique. En effet, de nombreuses études observationnelles ont montré un taux de mortalité plus important, chez les personnes qui survivent à un épisode de choc septique.

Parmi les causes responsables de ce surcroît de mortalité chez ces patients, des travaux récents mettent en évidence plusieurs facteurs potentiellement impliquée :

- une augmentation ses événements cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux) dans l'année suivant un épisode septique sévère, probablement du fait d'une dysfonction endothéliale induite.

- une augmentation des épisodes infectieux via des dysfonctions immunitaires complexes et soutenues dans le temps, touchant à la fois le système immunitaire inné et adaptatif, faisant suite à un choc septique.

Notre projet vise donc à mieux comprendre les mécanismes biologiques à l'origine de ces dysfonction endothéliales et leucocytaires.

L'un des mécanismes biologiques connu pour altérer de manière durable les fonctions endothéliales et leucocytaire est la sénescence induite.

En effet, la recherche sur les maladies cardio-vasculaire a révélé l'existence de cellules sénescents dans les muscles lisses et l'endothélium des vaisseaux des patients atteints d'athérosclérose. Il serait donc possible que la sénescence endothéliale contribue à l'installation ou à la progression des maladies cardio-vasculaires.

De même, l'immunosénescence consistant en une altération fonctionnelle de l'immunité innée et surtout de l'immunité adaptative pourrait être majorée après un choc septique.

L'objectif est in fine d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour des traitements plus efficaces et plus précoces. Notre projet sera réalisé à l'aide d'un modèle de rat en choc septique, d'origine polymicrobienne, par péritonite.

La règle des 3 R : réduire, raffiner, remplacer constituant le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale sera scrupuleusement respectée.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives (t-test, one way ou two-way ANOVA selon les expériences). Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- les animaux sont alors replacés dans leur cage d'origine avec des congénères qui ont subi la même opération. Un gel nutritif est présent dans la cage ainsi que la nourriture standard déposée au fond pour faciliter la prise de nutriments et l'hydratation, ainsi que du coton cardé pour permettre aux animaux de se maintenir au chaud.

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

Remplacer : Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible car les effets d'un choc septique sur l'ensemble de l'organisme sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires chez l'être vivant.

Cependant, l'identification préalable des mécanismes moléculaires probablement impliqués ont sont en cours d'étude à l'aide de méthode alternative (modèle de cultures cellulaires stimulées par une endotoxine).

L'ensemble de ces expériences nécessitera au maximum 106 rats.

10921 Le projet porte sur l'évaluation de l'efficacité d'un additif alimentaire commercial contre la furonculose à *Aeromonas salmonicida salmonicida* (Ass) de la Truite Arc-en-Ciel. La furonculose est à l'origine de mortalité importante dans les élevages truiticoles et de pertes économiques non négligeables du fait de mortalité et d'une non-valeur commerciale des animaux morbides (présence de furoncles musculaires). Actuellement, les moyens de contrôle de cette infection sont limités. La vaccination est peu utilisée par les éleveurs du fait d'une efficacité controversée et d'un manque d'innocuité. L'antibiothérapie est le principal moyen de contrôle actuellement. Cependant, l'existence d'isolats multi-résistants pourrait compromettre l'efficacité de ces traitements. Dans le cadre actuel sur la limitation des intrants médicamenteux dans les élevages (plans Ecoantibio), notre objectif est d'évaluer des méthodes de biocontrôle de la furonculose afin de diminuer l'usage d'antibiotiques dans les élevages. Le projet a pour but d'évaluer l'effet immunostimulant d'un additif alimentaire composé de plantes aromatiques, d'huiles essentielles et de prébiotiques sur la santé des poissons.

Pour ce projet 350 truites de 50 g seront utilisées. Les différents lots constitués de 45 poissons seront réalisés en triplicat (3x15 poissons). Les poissons seront répartis en 5 lots : 1 lot de poissons qui seront nourris avec l'additif et infectés avec Ass, 1 lot de poissons nourris avec l'additif et non infectés, 1 lot de poissons nourris sans l'additif et infectés avec Ass, 1 lot de poissons nourris sans l'additif, infectés avec Ass et traités avec un antibiotique adapté et un lot de poissons nourris sans l'additif et non infectés. L'expérimentation durera 8 semaines. Les poissons seront infectés avec Ass 4 semaines après avoir été nourris avec l'additif et seront suivis 4 semaines supplémentaires. Toutes les manipulations (pesée, pose de transpondeur, prélèvement sanguin, challenge infectieux) seront réalisées après anesthésie des poissons. Les paramètres d'ambiance (température, oxygénation) seront mesurés quotidiennement et dans chaque bac afin de contrôler les valeurs critiques d'élevage. Tous les individus moribonds seront retirés de l'expérimentation et euthanasiés. L'objectif de l'étude étant d'évaluer l'effet d'un additif alimentaire sur l'immunocompétence de truites, cela ne peut

se faire que sur animaux vivants.

10922 Au cours du siècle dernier, l'intensification des activités humaines s'est accompagnée d'une accumulation de CO₂ dans l'atmosphère de notre planète. En se dissolvant dans les océans, ce surplus de CO₂ entraîne une baisse du pH et de la teneur en carbonate des eaux marines, processus connu sous le nom d'acidification des océans. Combiné au réchauffement climatique, l'acidification actuelle des océans menace des espèces marines. Cette étude s'insère dans un projet dont les objectifs généraux sont de mieux comprendre les réponses physiologiques et comportementales des populations de poissons face à l'acidification progressive des océans.

Dans ce contexte, le projet vise à analyser les effets de l'acidification de l'eau sur le processus de reproduction, en particulier sur la maturation sexuelle chez le bar européen

(*Dicentrarchus labrax*) exposé à trois conditions différentes de pH : pH témoin (pH 8, condition actuelle), pH 7,8 (condition prévue pour 2050) et pH 7,6 (condition prévue pour 2100). Les effets de l'acidification de l'eau sur la maturation sexuelle des poissons seront évalués en dosant les concentrations de stéroïdes sexuels (œstradiol, testostérone, 11-kétotestostérone) dans le plasma

en décembre (pré-gamétogenèse), janvier (gamétogenèse précoce), février (gamétogenèse tardive) et en avril (post-gamétogenèse).

Le nombre total d'animaux utilisé est de 90.

Le projet s'inscrit dans le respect de la règle éthique des 3R :

- Remplacer : il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car nous cherchons précisément à identifier les mécanismes physiologiques contrôlant la reproduction des poissons qui dépendent des conditions de pH de l'eau.

- Réduire : le nombre d'animaux est optimisé afin de permettre des analyses statistiques fiables malgré la variabilité de la réponse hormonale entre les individus.

- Raffiner : l'élevage des poissons est réalisé par du personnel compétent dans des conditions zootechniques optimales pour l'espèce. Toutes les manipulations sont expressément conçues dans le but de réduire au maximum le stress des animaux afin de garantir leur bien-être. L'expérimentation et les prélèvements seront réalisés par du personnel formé et habilité dans le plus total respect des règles d'hygiène, de sécurité et d'éthique.

10923 Cette formation mise en place par la Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) de l'établissement utilisateur aura pour but de former les nouveaux expérimentateurs à la manipulation des rongeurs. Il s'agira plus précisément de la préhension, de la contention, d'injection en intrapéritonéale pour l'anesthésie fixe et d'une technique de mise à mort.

Bien sur cette formation ne remplacera pas les formations réglementaires que les expérimentateurs devront suivre dès que possible. Cette formation aura également comme objectif de sensibiliser les expérimentateurs au bien-être animal et ainsi minimiser les contraintes imposées aux animaux lors des procédures expérimentales.

Cette formation nécessite donc le recours à l'animal afin d'apprendre les gestes de base qui seront ensuite utilisées dans les procédures expérimentales des différents projets de l'établissement utilisateur.

Deux sessions seront organisées par mois avec un maximum de participants égal à 6 et un nombre de souris maximum égal à 12 par session (2 par participants). En ce qui concerne les rats, il ne sera utilisé que deux rats par session en fonction de la demande, cette espèce étant moins utilisée dans les projets que la souris. Les animaux utilisés pour ces formations seront des animaux sortis de procédures expérimentales. Il y aura donc utilisation au maximum de 288 souris et de 48 rats par an, soit un total sur 5 ans de 1440 souris et 240 rats. Les procédures de ce projet respecteront le bien-être animal en limitant la douleur et le stress. Les conditions d'hébergement seront conformes à la réglementation, les animaux disposeront de nourriture et d'eau *ad libitum*, ainsi qu'un milieu enrichi.

10924 Nos étudiants suivent une formation qui qualifie le personnel appliquant des procédures expérimentales aux animaux, spécifique aux modèles rongeurs (niveau A). Cette formation réglementaire nous permet de former des techniciens hautement qualifiés en expérimentation animale, qui sont des professionnels très recherchés dans notre bassin d'emploi. Nous allons réduire fortement le recours à l'animal en enseignement dans les prochaines années et dès les prochains mois. Il nous semble cependant essentiel, pour les étudiants suivant la formation, de maîtriser certains gestes expérimentaux dont la réalisation de prélèvements sanguins.

Ce projet correspond à deux séances de travaux pratiques :

- La première consiste en l'énoncé de recommandations, des démonstrations des techniques de prélèvements sanguins, sur rats et souris, à l'aide de supports vidéos et à l'entraînement des étudiants sur des supports non vivants = Remplacement

- La seconde est une mise en pratique chez le rat analgésié (lidocaïne) puis anesthésié par voie gazeuse (isoflurane) = Raffinement. Sur chaque rat seront réalisés 4 prélèvements sanguins de faible volume (quelques dizaines de microlitres), sur veines caudales et saphènes, sur 4 sites distincts. Les prélèvements sanguins seront également utilisés pour un dosage de glycémie et

serviront donc à acquérir quelques notions de physiologie métabolique, sans recourir à l'emploi d'animaux supplémentaires = Réduction.

Les animaux seront réveillés dans le calme et près d'une source de chaleur, avec un suivi après réveil puis un suivi quotidien de leur bien-être à l'animalerie. Une analgésie pourra être maintenue en cas de mal-être et des points limites auront été établis.

Les étudiants manipuleront un rat par binôme mais celui-ci pourra être manipulé de nouveau, après 7 jours et total rétablissement, par un nouveau binôme d'étudiants apprenant le même geste (réduction). Ainsi, pour 136 apprenants, nous aurons recours à l'utilisation de 48 rats par an, soit 96 rats pour 2 années de formation.

Cependant, les actes pratiqués étant de sévérité modérée, ces animaux ne seront pas euthanasiés à la fin du projet mais, sous réserve d'un rétablissement complet et après accord du vétérinaire référent, seront réutilisés pour d'autres manipulations se déroulant au sein de notre établissement, dans le cadre de projets autorisés. De plus, ces enseignements viennent remplacer une séance de TP impliquant une procédure sans réveil, pour laquelle les animaux étaient sacrifiés, sans possibilité d'une telle réutilisation. Tout ceci va dans le sens d'une réduction du nombre d'animaux manipulés.

10925 L'incidence des bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) et des exacerbations associées est en augmentation constante dans le monde entier. La BPCO contribue à une large mobilisation des ressources en santé, et représente un coût financier important (3.5 et 55 milliards d'euros par an en France et en Europe respectivement).

La fumée de cigarettes est le facteur étiologique principal dans le développement des BPCO. Mais, nous savons maintenant que la BPCO est exacerbée (aggravée) par les infections respiratoires opportunistes. En effet, ces exacerbations des BPCO représentent une cause majeure de morbidité et de mortalité. Malheureusement, nous ne savons pas à ce jour comment se développent ces exacerbations et les thérapies sont rares et inefficaces. Cela est dû à la mauvaise compréhension des étapes qui conduisent à cette exacerbation d'une part, et au manque de modèles animaux expérimentaux mimant de près la pathologie humaine, d'autre part. Dans ce projet, nous nous intéresserons à des pathogènes typiques fréquemment isolés chez les patients BPCO exacerbés, en l'occurrence *Haemophilus influenzae* non typable (NTHi) et des spores d'*Aspergillus fumigatus* (sAF).

Une des caractéristiques de cette situation pathologique est le recrutement important de globules blancs, notamment de polynucléaires neutrophiles (PNN), qui libèrent trois molécules appelées sérine protéases, plus spécifiquement élastase du neutrophile (NE), cathepsine G (CG) et protéinase 3 (PR3). Ces molécules sont fortement suspectées dans la destruction du tissu respiratoire. Mais, leur mécanisme d'action et importance relative dans l'exacerbation de la BPCO ne sont pas encore élucidés. Nos objectifs sont donc de comprendre les mécanismes inflammatoires et immunitaires médiés par ces sérine-protéases du neutrophile en réponse à l'infection par les pathogènes NTHi et sAF chez des souris ayant développé une BPCO suite à l'inhalation de la fumée de cigarettes, afin d'aider à mieux traiter les patients.

Dans ce projet, les souris sauvages et celles déficientes dans les sérine protéases seront exposées tous les jours pendant 10 minutes à la fumée d'une cigarette 2 fois par jour pendant 4 mois. Durant ces 4 mois, il y aura 2 expositions aux pathogènes (NTHi ou sAF) à 6 semaines d'intervalle, ce qui mime de près le nombre d'exacerbations annuel observé chez les patients. A la fin des expositions, les souris seront sacrifiées et leurs poumons analysés pour une meilleure compréhension de cette phase d'exacerbation.

Bien que les différents modèles existants, notamment ceux des cultures cellulaires, renseignent sur l'interaction des cellules et des agents pathogéniques (dans notre cas, la fumée de cigarettes et *Haemophilus influenzae* ou *Aspergillus fumigatus*), ils ne permettent pas de reproduire à l'identique les conditions physiopathologiques étudiées dans ce projet d'expérimentation animale. Notre protocole expérimental a été conçu de façon à réduire le nombre de souris utilisées au strict nécessaire (128 souris) pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. L'expérimentation a également été conçue de façon à réduire, supprimer ou soulager l'inconfort et l'angoisse des

animaux, par exemple en les habituant aux chambres d'enfumage une semaine avant l'entrée en protocole, dans les mêmes conditions que lors de l'exposition à la fumée de cigarette, afin de diminuer leur angoisse et leur stress. Des points limites ont également été définis pour soulager les animaux au cas où surviendrait une souffrance de ces derniers.

10926 Les cellules immunitaires nous protègent des agressions par des agents extérieurs. Ces cellules proviennent de cellules dites souches, formées au cours de la vie embryonnaire. Dans l'organisme adulte et en particulier chez les mammifères, ces dernières sont localisées dans la moelle osseuse où elles sont au repos dans leurs « niches ».

Les cellules souches de l'immunité naissent chez l'embryon à partir de la paroi des vaisseaux. Après multiplication dans les niches embryonnaires, elles donneront naissance à toutes les cellules immunitaires de l'adulte.

L'étude de la formation des cellules souches et de leurs niches est fondamentale pour comprendre la constitution du système immunitaire ; c'est l'objectif scientifique de ce projet.

Nous utilisons le modèle du danio zébré (ou poisson zèbre), qui produit des cellules souches de l'immunité comme chez les mammifères. Il offre de nombreux avantages car il est transparent ce qui permet de voir, par imagerie intravitale non-invasive, la formation des cellules souches à partir des vaisseaux, leur transport dans la circulation et l'immobilisation dans les niches. Les expériences prévues dans ce projet sont impossibles à réaliser chez tout autre animal ou chez l'homme.

Ce projet nécessitera la mise en place de deux procédures expérimentales dont le but est de créer des lignées de poisson zèbre génétiquement modifiées.

La première procédure, de classe légère, permettra d'insérer dans le génome, soit des transgènes codant pour des protéines fluorescentes, soit des petites séquences ADN qui permettront d'insérer des étiquettes peptidiques dans la séquence de protéines d'intérêt. Dans le premier cas, cela permettra de suivre, à l'aide de la microscopie en fluorescence, des protéines jouant un rôle dans la formation des cellules souches ainsi que la migration des cellules des niches. Dans le second cas, cela permettra de modifier les gènes codant pour des protéines d'intérêt et de pouvoir les visualiser en microscopie.

Tous les transgènes et les insertions des petites séquences ADN seront testés au préalable afin de vérifier qu'ils ne modifient pas le développement des embryons (tests avant 5 jours post-fécondation).

La seconde procédure, de classe modérée, permettra d'établir des lignées pour lesquelles certaines parties de gènes codant pour des protéines d'intérêt seront tronquées afin de savoir si ces protéines sont essentielles, ou non, à la formation des cellules hématopoïétiques. Pour cette procédure, les embryons injectés feront l'objet d'une surveillance accrue. Tous les animaux porteurs de délétions seront ensuite gardés à l'état hétérozygote (une seule des deux allèles portant la mutation) pour minimiser les risques de phénotype dommageable.

Les cellules souches hématopoïétiques ne peuvent pas, à l'heure actuelle, être produites *in vitro* (d'où l'intérêt des études comme la nôtre qui permettent de définir les paramètres et facteurs essentiels au processus). Le danio zébré est un modèle incontournable car la formation des cellules souches hématopoïétiques et des niches peuvent être visualisées de façon non-invasive en microscopie dynamique à fluorescence.

L'ensemble des procédures conduira à utiliser 2390 poissons.

10927 Au cours d'une infection l'activation de senseurs de l'immunité innée, dont les inflammasomes, donne lieu au déclenchement d'une réponse inflammatoire permettant de combattre et de stopper l'infection. Cependant, l'inflammation mal contrôlée peut devenir délétère pouvant aller jusqu'à la mort du patient. Le lipopolysaccharide (LPS, également appelé endotoxine) est un des composants de la paroi de certaines bactéries. L'injection intrapéritonéale de LPS induit l'activation de la voie des inflammasomes et provoque ainsi une inflammation systémique. Ce modèle nommé choc endotoxique constitue un modèle de choix pour l'étude de la voie des inflammasomes *in vivo*. Nous avons récemment identifié *in vitro* de nouveaux régulateurs de l'inflammasome. Suite à cette

validation extensive *in vitro*, nous cherchons à valider leur pertinence *in vivo* dans un modèle murin. Deux nouveaux régulateurs, un facteur de transcription et une protéine inductible par l'interféron seront testés.

Pour cela, la réponse au choc endotoxique de plusieurs lignées transgéniques pour des régulateurs connus et/ou à tester des inflammasomes sera comparée avec celle de souris non modifiées génétiquement. Ce projet pour être mené à bien nécessitera l'utilisation de 240 souris au maximum.

Une expérience pilote sera réalisée pour tester l'impact d'antalgiques sur les résultats expérimentaux afin de déterminer les modalités d'usage des antalgiques dans ce protocole.

Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations ont été mises au point avec des points limites suffisamment prédictifs pour respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et ainsi permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal, les études *in vitro* ne nous permettant pas de reproduire les mécanismes de l'inflammation étudiés dans ce projet. En particulier, l'apport de gel hydratant et des facilités d'accès à la nourriture seront mis en place pour limiter les pertes de poids associés à cette réponse inflammatoire et à la fièvre associée et les expériences seront réalisées en concertation étroite avec une autre équipe pour limiter le nombre d'animaux.

10928 Le but de ce projet consiste à évaluer l'implication des voies de signalisation de mort et survie cellulaires impliquées dans le développement tumoral lors du vieillissement. Des modèles animaux sont absolument nécessaires à ces études car le vieillissement, et le développement tumoral corrélé, est un processus complexe, impossible à reproduire fidèlement *in vitro*, dans des modèles de cellules isolées. Nous avons choisi le poisson *N. furzeri* comme modèle pour la facilité d'hébergement, d'élevage et ses caractéristiques particulières. En effet, le poisson *N. furzeri* a une durée de vie de 4-6 mois en conditions optimales de laboratoire qui en font un excellent modèle animal pour étudier le vieillissement. De plus, il a été montré que lors du vieillissement, ce poisson développe spontanément plusieurs néoplasies. Nous effectuerons des expériences de survie et de traitements anti-tumorales. Ce projet se dessine sur 5 ans et il est basé sur 5 procédures. L'étude sera arrêtée si les expérimentations initiales invalident l'hypothèse de travail. Pour la réalisation de cette étude, nous chercherons à regrouper les expérimentations dans le but de garder un nombre minimum d'animaux pour les groupes contrôles. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie. Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Le nombre maximal de poissons *N. furzeri* nécessaires à la conduite de ce projet est évalué à 2320 au maximum.

10929 Projet : L'arthrose est une maladie dégénérative des articulations. Elle se caractérise par une disparition du cartilage et une modification de l'os sur lequel il repose. On sait actuellement que les communications entre le cartilage et l'os jouent un rôle crucial dans le maintien de l'articulation dans un état sain. L'interface entre le cartilage et l'os se modifie au cours de l'arthrose avec notamment un développement de vaisseaux.

Nous pensons que le développement de ces vaisseaux à l'interface os/cartilage joue un rôle important dans la progression de l'arthrose. Nous voulons déterminer si l'inhibition sélective du développement de ces vaisseaux prévient ou limite le développement de l'arthrose.

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 440 rats expérimentaux pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

10930 Ce projet concerne l'évaluation de produits immunologiques destinés à protéger des espèces de carnivores domestiques contre certaines maladies infectieuses microbiologiques (virales ou bactériennes).

Il repose sur l'évaluation de la réponse immunitaire et de l'innocuité des produits immunologiques par l'analyse de marqueurs biologiques. La procédure constituant ce projet est de gravité modérée. Cette procédure prévoit un suivi de l'état général chez des animaux en bonne santé et le suivi des paramètres biologiques suivants : hémato-biochimiques, sérologiques, immunocellulaires, histologiques, virologiques et bactériologiques.

Ce projet est conçu en accord avec les textes en vigueur de la Pharmacopée Européenne, ainsi que les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- un caractère de stricte nécessité : cette procédure ne peut pas, pour le moment, être remplacée par des méthodes alternatives car elle répond à l'obligation réglementaire ou scientifique d'être conduite sur l'espèce de destination du produit ou sur un modèle de rongeurs le cas échéant ;
- un nombre d'animaux envisagé qui est :
- soit en conformité avec la réglementation et la pharmacopée
- soit étayé à l'aide d'un raisonnement scientifique et/ou d'une analyse statistique et/ou d'une recherche bibliographie permettant l'atteinte de l'objectif du projet.

Au total, un nombre maximum de 300 carnivores par an, de 3 espèces différentes, sans dépasser 1000 carnivores domestiques sur 5 ans et un nombre maximum de 5000 rongeurs sur même période seront impliqués dans ce projet.

- un hébergement des animaux en groupe avec présence d'enrichissement de manière à limiter le stress ;
- un recours à l'anesthésie générale, si nécessaire, pour garantir le bien-être animal
- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long des procédures ;
- des points limites adaptés et précisément définis afin d'éviter toute souffrance des animaux.

10931 La Sleeve gastrectomie (SG) est l'intervention de chirurgie de l'obésité la plus populaire en France. Elle consiste à tubuliser et réduire de 70% la taille de l'estomac. On la pratique comme une alternative au traitement de référence, le By-pass gastrique, qui consiste lui aussi à réduire la taille de l'estomac tout en y associant une importante dérivation intestinale. La SG est plus simple à réaliser tout en restant très efficace à moyen-long terme.

Concernant sa sécurité, la principale limite de cette technique en postopératoire est la fistule gastrique ; cette fistule correspond à un défaut de cicatrisation de l'estomac, le plus souvent situé à la jonction entre l'oesophage et l'estomac (appelée région du cardia) pouvant entraîner des

complications infectieuses graves. Les experts de cette technique ont permis de diminuer la fréquence de cette fistule à 2% ; mais la problématique repose sur la difficulté à traiter cette fistule, car son traitement est long et difficile, associé à une morbi-mortalité très importante et des coûts de santé majeurs.

La prise en charge de la fistule après SG repose sur trois critères :

- l'état clinique du patient ;
- le délai d'apparition de la fistule définissant son type (fistule aiguë : <7 jours, fistule précoce : 1 - 6 semaines, fistule tardive : 6-12 semaines, fistule chronique > 12 semaines) ;
- sa localisation (proximale, moyenne ou distale).

Lorsque la fistule devient chronique, une reprise chirurgicale est nécessaire. Cependant, celle-ci est complexe, mutilante (ablation irréversible et totale de l'estomac), avec une morbidité non négligeable. A ce jour, il n'existe pas de traitement « mini-invasif » alternatif ayant montré une vraie efficacité sur cette fistule chronique.

Le but de ce projet est de développer un traitement peu invasif de la fistule chronique après SG. Pour ce faire nous utiliserons un gel ayant des propriétés cicatrisantes que nous injecterons dans la fistule par voie endoscopique et par voie per-cutanée. On ajoutera au gel des vésicules extracellulaires de cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui possèdent des facteurs de croissance et des facteurs anti-inflammatoires.

Le porc charcutier, par ses similitudes anatomiques et histologiques avec l'Homme est un excellent modèle expérimental. La taille et les mensurations de l'animal permettent l'utilisation du matériel et des techniques endoscopiques et chirurgicales employés chez l'Homme. Ce modèle est reconnu et validé dans la littérature scientifique pour la chirurgie de l'obésité. Son utilisation est nécessaire car seule l'expérimentation *in vivo*, mimant le plus fidèlement possible l'environnement tissulaire après SG compliquée de fistule permettra de répondre à la question de la cicatrisation du trajet fistuleux. Les vésicules extracellulaires de CSM, en tant que nouvelle thérapie cellulaire, doivent également être testées *in vivo* avant leur application chez l'Homme. On injectera après création de la fistule chronique le gel seul, ou associé aux vésicules extracellulaires, afin de comparer à un groupe témoin sans traitement.

Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3R. Pour limiter le nombre d'animaux, l'apprentissage de la technique sera réalisé sur un modèle expérimental d'estomacs congelés issus de l'industrie agro-alimentaire. 18 porcs seront utilisés, ce nombre minimum est suffisant pour permettre une analyse statistique fiable et robuste. Les animaux seront soumis à une SG. Pour éviter toute souffrance, toutes les interventions auront lieu sous anesthésie générale et des antalgiques seront prévus en post-opératoire. La première étape consistera en la réalisation d'une chirurgie bariatrique de type sleeve à J0 avec mise en place d'une sonde gastro-cutanée pour créer la fistule pendant 4 semaines. Les animaux seront ensuite suivis cliniquement pendant 4 semaines (temps nécessaire à la mise en place du modèle de fistule) puis pendant 4 autres semaines (temps du traitement), quotidiennement en association avec notre équipe vétérinaire. Nous évaluerons le comportement, l'alimentation, l'hydratation, les signes de souffrance. Une grille précise d'évaluation des points limites sera définie et des antalgiques adaptés à ces points limites seront utilisés. Devant tout signe de souffrance non contrôlable et/ou intolérable d'un animal, nous procéderons à son euthanasie.

Les porcs seront suivis 1 fois par semaine après l'initiation du traitement de la fistule pendant 4 semaines, de manière endoscopique, clinique et radiologique.

Les résultats de ce projet permettront de mettre en place un traitement curatif des fistules chroniques après sleeve gastrectomie chez l'Homme. Cette technique innovante étant moins risquée et moins invasive et non mutilante par rapport à la chirurgie qui est le traitement de référence.

10932 Les salmonelles, agents zoonotiques, sont des bactéries fréquemment impliquées dans les toxi-infections alimentaires collectives dans les pays développés. Il s'agit de la seconde cause de

zoonose en Europe. Les animaux d'élevage, notamment les porcs, constituent des réservoirs de ces bactéries dont ils sont fréquemment porteurs sains. Le porc serait la première source de viande responsable des infections humaines à Salmonella. Si Salmonella ne provoque pas de maladie chez le porc, réduire sa prévalence et son niveau d'excrétion pourrait à terme permettre de mieux maîtriser le risque pour le consommateur.

De précédents essais nous ont laissé entrevoir que certains porcs pouvaient être considérés faiblement excréteurs et d'autres fortement excréteurs. Des études récentes ont mis en évidence l'importance de l'hétérogénéité de l'hôte dans l'infection et dans les différences d'excrétion. La présence de porcs fortement excréteurs de Salmonella dans les élevages participe à la dissémination et au maintien de la bactérie dans ces élevages. Ils contribuent également à amener dans la chaîne alimentaire un taux élevé de Salmonella augmentant ainsi le risque d'avoir des produits issus du porc contaminé. En détectant et en éliminant très tôt les porcs prédits à devenir fortement excréteurs dans les élevages, on réduira en conséquence l'apport en Salmonella sur la chaîne.

Le but de cet essai est donc d'identifier des porcs super-excréteurs pour ensuite étudier finement les particularités de leur microbiote intestinal et de leur réponse immunitaire pour mettre en évidence des marqueurs qui permettraient par la suite d'identifier précocement les porcs super-excréteurs, et ainsi les retirer des élevages et diminuer la dissémination de la bactérie dans l'élevage.

Dans cet essai, 40 porcelets seront inoculés suivant le même protocole, avec la même quantité de Salmonella, et l'excrétion sera suivie pendant 3 semaines. Cinq animaux supplémentaires serviront de témoin. Les fèces seront prélevées d'une part pour le suivi de l'excrétion et d'autre part l'étude du microbiote. Des prélèvements sanguins seront réalisés pour le suivi de la réponse immunitaire.

L'état de santé des animaux sera évalué tout au long de la phase d'expérimentation, du sevrage jusqu'à l'abattage, en particulier pendant les 3 semaines après l'inoculation par Salmonella. L'état de santé des porcs sera évalué aux travers d'examens cliniques quotidiens, du suivi des performances zootechniques et des analyses réalisées sur les prélèvements biologiques.

La procédure expérimentale sera menée dans le respect de la règle des 3R : réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique (45 animaux) ainsi que le raffinement des conditions d'hébergement. Ces mesures de raffinement viseront à assurer des conditions d'hébergement limitant l'anxiété potentielle des animaux (respect des densités, eau et nourriture à volonté, enrichissements adaptés, etc.) et un suivi clinique des animaux très précis en suivant une grille de notation reprenant les points limites et déclenchant, le cas échéant, une euthanasie compassionnelle. En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable. Les animaux utilisés sont nécessaires pour évaluer la colonisation et l'excrétion d'un pathogène zoonotique dont le porc est le principal réservoir.

10933 Dans les pays développés, la consommation alimentaire semble motivée par le plaisir plus que par le besoin de se nourrir. Ce phénomène, qui consiste à consommer un aliment pour son goût agréable (palatable), apparaît préoccupant puisqu'il peut devenir la cause de maladies comme l'obésité. Les activations cérébrales et les adaptations comportementales associées à ces troubles de l'alimentation pourraient partager des similitudes avec celles mises en place dans l'addiction, maladie du cerveau complexe et récurrente, qui n'est que partiellement comprise. Les changements neurobiologiques sous-jacents à la progression vers une consommation compulsive et une dépendance impliquent notamment des mécanismes épigénétiques.

Dans ce contexte, notre projet a pour but (1) d'établir un modèle murin de consommation excessive de sucre afin d'examiner les mécanismes biologiques sous-jacents ; (2) de caractériser les effets d'une surconsommation de sucre sur le comportement des souris ; et (3) de caractériser les changements d'expression de gènes et évaluer l'implication potentielle de régulations épigénétiques dans de telles régulations. En identifiant des changements durables, notre recherche permettra d'améliorer la compréhension des mécanismes centraux impliqués dans les troubles alimentaires. Finalement, nous espérons que cette étude permette à plus long terme d'identifier de

nouvelles cibles thérapeutiques dans le cadre du traitement des troubles de l'alimentation, comme l'obésité ou le diabète, maladies en lien avec la prise excessive de nourriture palatable.

Remplacement : Dans la mesure où nos travaux portent sur la caractérisation comportementale et moléculaire d'une prise alimentaire excessive, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier. **Raffinement :** La surveillance des animaux est journalière (observation visuelle, suivi de l'aspect général et de la posture) et une pesée quotidienne est réalisée lors du suivi des consommations, permettant de s'assurer du bien-être des animaux. De plus, nous avons optimiser les protocoles afin de limiter au maximum le nombre total d'injections intra-péritonéales reçues par les animaux et nous suivons tout particulièrement le site d'injection pour l'apparition de rougeur. **Réduction :** Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux pour permettre des analyses statistiques et avons adapté ce nombre selon le type d'expérience (8 souris/groupe pour l'immunohistochimie, 12 souris/groupe pour le comportement, 12 souris/groupe pour les analyses de biologie moléculaire,). De plus, l'analyse moléculaire ne sera faite sur les deux sexes que si les résultats comportementaux diffèrent entre sexe. Dans ce contexte de la règle des trois R, nous anticipons que ce projet nécessitera au total 956 ou 1084 souris maximum.

10934 Le scanner X également appelé tomodynamomètre ou scanographe, repose sur l'utilisation des rayons X qui ont la propriété de traverser les tissus de manière plus ou moins importante selon leur densité. Il peut être utilisé pour visualiser avec une grande résolution spatiale les structures osseuses (squelette, lésions osseuses) mais aussi les organes constitués de cavités anatomiques (reins, utérus, vascularisation) via l'utilisation de produits de contraste « radio-opaques ».

Dans ce projet de recherche translationnelle, d'une durée maximale de 5 ans, nous souhaitons développer des agents de contrastes nanoparticulaires permettant d'étudier les tissus mous chez la souris, en micro Scanner X. Cela n'est pas possible avec des agents de contrastes iodés utilisés en clinique, du fait de leur élimination rapide par les reins. L'objectif de ces nouveaux agents de contrastes, sera d'étendre les possibilités d'imagerie que fournit le micro Scanner X, pour l'imagerie d'organes internes tels que le foie, la rate, le cœur ou les reins en général difficilement visualisables par cette modalité.

Les objectifs de cette étude sont donc la mise en évidence et la quantification :

- d'un contraste suffisant de la formulation injectée dans le système vasculaire de l'animal ;
- d'une persistance de cet agent de contraste dans le système vasculaire.

Les composés qui seront testés sont sans danger pour l'animal. Ils sont composés d'huile et de surfactants compatibles avec l'administration parentérale (triglycérides à chaînes moyennes, Kolliphor ELP®) et la molécule active est le iobitridol, une molécule iodée utilisée en clinique. Ils seront administrés en intra veineux, sous anesthésie générale. Chaque souris sera scannée 11 fois sur trois jours pour étudier la cinétique de distribution des produits testés. La séquence de scanner pourra être modifiée en fonction de la rémanence de l'agent dans l'organisme. Les scanners seront arrêtés dès que le contraste observé dans les organes d'intérêt sera retombé au même niveau que le scanner de référence. Chaque acquisition dure 6 minutes. La réalisation des 11 examens sur un même animal représente une dosimétrie qui n'est pas néfaste pour celui-ci, l'injection du produit de contraste nécessitant la pose d'un cathéter intraveineux, la procédure est classée modérée. Chaque souris est euthanasiée à l'issue du dernier examen d'imagerie (72h après l'injection du produit de contraste ou après un retour au contraste initial). Nous prévoyons de tester 5 molécules par an. Le pouvoir contrastant de chacune d'elles sera évalué sur trois souris. Une souris supplémentaire sera prévue pour chaque lot en cas d'échec de la cathétérisation caudale. Ce projet implique donc l'utilisation de 100 souris sur 5 ans. La règle de réduction s'applique pleinement car l'imagerie permet un suivi dans le temps du même animal. Aucun effet néfaste n'est attendu sur les animaux. Ils seront hébergés par cage de 4 en respectant les groupes sociaux et ils auront une phase d'acclimatation d'une semaine avant la réalisation de l'imagerie. Une fois incluses dans le protocole les souris seront observées et pesées quotidiennement dans le but de prévenir tout risque de mal-être.

10935 Ce projet est destiné à durer 4 années.

Les mots clés pour le caractériser sont : santé humaine – plaques d'athérome – caractérisation des plaques – évaluation des zones potentielles de rupture – IVUS et sonde endovasculaire – nouvelle approche d'investigation – modèle animal pertinent - preuve de concept expérimentale.

Type du Projet : Recherche translationnelle ou appliquée

Les maladies cardiovasculaires, au premier rang desquelles les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux, constituent la première cause de mortalité et de morbidité dans le monde. Nous apportons de nouveaux outils d'imagerie permettant la reconstruction de cartes d'élasticité des parois artérielles. Cela facilitera le diagnostic clinique en préopératoire des lésions vulnérables à haut risque de rupture (à partir de l'identification de la rigidité des constituants de la plaque d'athérome) tout en aidant les cardiologues dans la planification de leurs gestes chirurgicaux. Ces outils peuvent apporter également de nouveaux éléments d'analyse sur l'évolution de la pathologie inflammatoire.

Nos travaux ont montré que la prédiction de la rupture d'une plaque vulnérable nécessitait non seulement la connaissance de sa morphologie, mais aussi celle des propriétés mécaniques de tous ses constituants. Les cardiologues sont toujours en attente d'un outil d'exploration clinique permettant d'évaluer en interventionnel et en temps réel les propriétés mécaniques de tous les constituants de la plaque, ainsi que la répartition spatiale des contraintes intrapariétales qui sont responsables de la rupture de la plaque.

Le premier objectif de ce projet est d'évaluer les performances des nouvelles modalités d'investigation basées sur l'utilisation d'un système d'exploration intravasculaire par ultrasons (IVUS) utilisant des sondes introduites au niveau des zones d'athérome, les premières études contrôlées ayant été réalisées *in vitro* sur des fantômes vasculaires. Notons qu'une étude préliminaire portant sur la faisabilité de l'application de cette technique a été aussi menée *in vivo* sur l'homme. Cependant, le manque de références histologiques de ces données ne nous permet pas de vérifier la validité de nos techniques.

Le second objectif est de vérifier les corrélations existantes entre les informations générées lors de cette étude chez l'animal avec les observations histopathologiques réalisées post-mortem au niveau précis des sections artérielles exposées au système IVUS/sondes.

L'espèce animale retenue pour cette étude est le porc, avec une souche génétiquement sélectionnée pour développer des plaques d'athéromes en suivant un régime alimentaire hyperlipidique et qui a fait l'objet de diverses publications sur son intérêt en tant que modèle pertinent pour mimer le développement des plaques chez l'Homme.

Compte tenu de la variabilité de la nature des plaques d'athérome (avec ou sans calcification, importance de l'inflammation, infiltration cellulaire,..) et de la vitesse de leur développement, il est certain que nous aurons des animaux présentant des plaques assez hétérogènes, ce qui rend difficile une exploitation statistique des données. C'est pourquoi nous avons opté pour retenir dix porcs pour ce projet qui durera 4 ans.

Effets néfastes attendus – degré de sévérité :

Les travaux de la procédure, classée sans réveil, se feront sur des animaux profondément anesthésiés et la mise à mort aura lieu en fin d'expérimentation, la procédure ne laisse aucune place à la douleur ou à la souffrance de l'animal.

Application des 3Rs

1. Remplacement : si les premiers essais de mise au point de la reconstruction de cartes d'élasticité à partir de séquences IVUS ont pu se faire *in vitro* sur des fantômes d'artères et *in vivo* sur des tissus humains, il était indispensable de corrélater ces résultats avec des essais sur l'animal de manière à disposer simultanément de plaques d'athérome explorées en conditions physiologiques et dont la constitution histologique est connue.

2. Réduction : afin de limiter au maximum le nombre d'animaux, les investigations seront menées sur toutes les plaques d'athéromes disponibles sur chaque animal, au niveau des coronaires mais aussi des artères carotides qui sont chez l'Homme les lieux de prédilection pour ces plaques. Par

ailleurs l'étude porte sur un nombre maximal de 10 animaux, la procédure en cours ne concerne pour le moment que 5 animaux : 1 pilote + 4 avec un régime alimentaire hyperlipidique. Les cinq autres porcs ne seront utilisés que si les objectifs fixés ne sont pas atteints.

3. Raffinement : les porcs issus d'une souche génétique particulière qui ont été retenus pour ce projet représentent le meilleur modèle animal pour l'étude des plaques d'athéromes, d'une part en raison de la grande proximité physiologique du système cardio-vasculaire avec celui de l'Homme, mais aussi parce qu'il a été très souvent cité dans les articles scientifiques consacrés à cette problématique.

De nombreuses actions de raffinement seront mise en place comme : une phase d'acclimatation de minimum 4 jours, le passage régulier de l'animalier dans l'enclos, le fait que celui-ci habitue le porc à sa présence, le caresse au niveau du cou, l'utilisation d'une crème de type Lidocaïne appliquée au niveau du cou avant l'anesthésie, et pour finir, l'utilisation d'une seringue + prolongateur, permettant l'induction de l'anesthésie à distance (donc avec moins de stress) de l'animal. Enfin, dans le cadre de l'application de la règle des 3R, des laboratoires seront contactés afin de venir prélever du matériel biologique (peau, oreilles, sang, reins ...) en post mortem.

10936 L'objectif de ce projet est de tenter de corriger une atrophie et une faiblesse musculaire observées dans des souris ne disposant plus d'une protéine spécifique s'exprimant dans les muscles. Ce modèle animal permet d'étudier une pathologie humaine : les dystrophies myotoniques. Ces maladies génétiques affectent 1 adulte sur 8000 et sont donc relativement fréquentes. Les dystrophies myotoniques sont dues à des mutations de l'ADN qui entraînent des altérations (atrophie et faiblesse) des muscles squelettiques. Nos travaux précédents montrent qu'un gène, spécifique intervenant dans la structure des membranes des cellules musculaires participe à ces altérations musculaires. Nous souhaitons donc essayer de corriger ces altérations par thérapie génique, notamment par l'injection d'un virus modifié qui déclenchera l'expression de ce gène dans les tissus ciblés.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle *in vitro* ne nous permet d'étudier les symptômes de perte de la locomotion typiques des dystrophies myotoniques. De plus, la souris est un modèle déjà utilisé et bien étudié, du fait des similitudes avec la pathologie humaine.

Raffinement :

Afin de limiter la douleur induite par les symptômes, nous n'étudierons que les premières étapes de leur apparition. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur ou d'une altération de l'état général des animaux, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance. Enfin, pour éviter tout souci chez les animaux servant à établir et maintenir la lignée murine, nous utilisons une technique d'expression conditionnelle, permettant d'induire la mutation génétique conduisant à l'apparition des symptômes, uniquement chez les animaux à étudier.

Réduction :

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de virus à injecter, les temps d'analyses et que l'étude de groupes de 30 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 120 souris réparties en quatre groupes. Plus en détails, nous prévoyons l'injection de 30 souris contrôles et 30 souris mutantes (modèle des dystrophies myotoniques) avec un virus contrôle et 30 souris contrôles et 30 souris modèle des dystrophies myotoniques avec un virus exprimant le gène thérapeutique. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les muscles prélevés pour éviter des doublons des procédures expérimentales.

10937 L'épilepsie touche plus de 50 millions de personnes dans le monde. Dans environ un tiers des cas, les patients continuent de présenter des crises fréquentes malgré les traitements antiépileptiques.

Il est nécessaire de développer de nouveaux médicaments antiépileptiques, agissant au niveau de nouvelles cibles, afin de prévenir la récurrence des convulsions. L'épilepsie du lobe temporal mésial (MTLE) est la forme la plus commune d'épilepsie réfractaire. La plupart des caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques du MTLE humain peuvent être reproduites chez la souris par l'injection de kainate au niveau de l'hippocampe dorsal (modèle de souris MTLE). Les souris ont un cerveau assez complexe pouvant générer les activités épileptiques. Bien que les animaux ne puissent pas être remplacés dans nos expériences, nous prenons les mesures afin de réduire leur utilisation. Nous raffinons sans cesse l'hébergement et utilisation des animaux afin de réduire la douleur, l'angoisse et le stress. Pour ce projet, une seule espèce est utilisée, la souris au nombre de 45. La mise en place de ce modèle permettra de valider un modèle d'épilepsie de qualité, robuste et reproductible, bien caractérisé et prêt à l'emploi pour des tests précliniques de drogue appliquées pour le traitement de l'épilepsie. En utilisant d'électrophysiologie et des tests comportementaux, nous mesurerons sur ce modèle de souris MTLE l'apparition de décharges électriques hippocampique (structure du cerveau) et les conséquences de telles décharges sur la mémoire et les facultés motrices cognitives. L'effet de molécule, comme le diazepam (utilisé dans la prise en charge des états de mal épileptiques), connu pour réduire le nombre de décharge dans ce modèle sera utilisé pour validation. Ce modèle murin, déjà décrit dans la littérature, fournira un outil efficace mimant les formes d'épilepsie résistante aux médicaments connus et permettra de tester de nouvelle(s) stratégie(s) thérapeutique(s) pour déterminer l'efficacité et l'innocuité de molécule à usage humain. L'ensemble du projet est mis en œuvre dans l'application au maximum des 3R. L'utilisation de culture cellulaire, et d'échantillons permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés. L'enrichissement maisonnettes et neslets est ajouté pour toutes les cages.

10938 Des études scientifiques récentes sont en faveur d'un effet de la lumière sur les pathologies de la surface oculaire et dans la douleur oculaire. Ceci est d'autant plus important car les patients souffrant de ces pathologies sont souvent photophobes. L'objectif de ce travail est d'étudier les mécanismes de phototoxicité de la lumière bleue impliqués dans la pathogénèse de la douleur oculaire liée à la photophobie : pour cela, nous conduirons, sur des souris exposées aux lumières bleue mais aussi jaune (comme souris contrôle), des tests comportementaux ainsi que des études biochimiques et de biologie moléculaire, afin de caractériser les différents marqueurs liés à l'inflammation dans les voies nociceptives trigéminées.

Au total 240 animaux seront nécessaires à cette étude en incluant les pré-tests et les contrôles.

L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet ; le comportement animal ne peut être étudié sur des modèles de cellules en culture. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les animaux bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse). Pour les procédures de chirurgies, la douleur sera prévenue par administration d'opioïdes en pré et post opératoire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien-être.

10939 La vaccination est l'une des avancées majeures de la médecine moderne. Elle a permis de réduire grandement la prévalence de nombreuses maladies telles que la variole et le maintien d'une bonne couverture vaccinale est indispensable pour éviter la résurgence de ces maladies infectieuses. Bien que l'utilité de la vaccination ait été amplement démontrée, une défiance croissante de la population vis-à-vis de la vaccination a émergé depuis quelques années, notamment sur la question de la sécurité des adjuvants présents dans les vaccins. L'oxyhydroxide d'aluminium (alum) est utilisé pour ses propriétés d'adjuvant vaccinal depuis 1927. Il demeure l'adjuvant le plus utilisé, mais les mécanismes par lesquels il stimule la réponse immunitaire sont encore largement incompris. Généralement bien toléré, l'alum pourrait cependant être à l'origine de troubles chroniques occasionnels chez des sujets prédisposés. En effet, de rares sujets vaccinés présentent des

douleurs musculaires retardées et diffuses, un état d'épuisement chronique et des troubles cognitifs invalidants. Ces symptômes, associés à la présence d'un bouton inflammatoire chargé en particules d'aluminium au niveau du site d'une immunisation préalable avec un vaccin adjuvanté en hydroxyde d'aluminium, permettent de diagnostiquer une condition pathologique décrite au laboratoire comme la Myofasciite à Macrophages (MFM).

Chez les patients MFM, des mutations génétiques ponctuelles touchant un mécanisme de détoxification cellulaire (l'autophagie) qui entre en jeu dans l'élimination de l'alum suite à une vaccination ont été mises en avant.

Le présent projet repose sur l'hypothèse qu'un défaut dans le mécanisme autophagique permettrait un transport plus important de l'alum vaccinal jusqu'au cerveau, où il induirait un effet neurotoxique conduisant aux troubles observés chez les patients MFM. Notre but est de comprendre l'implication de l'autophagie dans les mécanismes de transport de l'alum vaccinal depuis le muscle injecté jusqu'au cerveau et l'effet de l'accumulation cérébrale de l'alum par une étude comportementale réalisée chez la souris, afin de mettre en avant d'éventuels troubles cognitifs communs avec les patients MFM.

Lors d'une précédente étude visant à induire une déficience du processus autophagique chez la souris exposée à de l'hydroxychloroquine (HCQ), nous avons évalué les effets tissulaires de cette molécule sur le long terme (2 à 4 mois après injection). Une nouvelle analyse de la littérature nous a permis de nous orienter vers un effet beaucoup plus précoce de cette molécule sur l'autophagie (de l'ordre de quelques heures). Nous souhaitons donc à présent vérifier que notre molécule choisie (HCQ) perturbe bel et bien le processus autophagique dans ces délais beaucoup plus courts (à partir de 4 heures post-injection), temps qui correspondront dans une prochaine expérimentation à ceux des injections d'adjuvants aluminiques. Cette étude à court terme, complémentaire de la précédente, sera réalisée sur 120 souris C57BL/6J (60 femelles et 60 mâles) âgées de 2 mois en début d'expérimentation.

Les principes de remplacement, réduction et raffinement ont été pris en compte pour construire les protocoles expérimentaux de ce projet. L'étude de la distribution systémique d'un agent pharmacologique ne peut s'effectuer que sur les organismes entiers et ne peut donc être substitué par une étude *in vitro*. La souche de souris C57BL/6J a été sélectionnée pour sa consanguinité réduisant la variabilité interindividuelle. Le nombre d'injections sera réduit au minimum pour le bien-être des animaux et des points limites ont été intégrés au protocole pour limiter le stress et la souffrance des animaux. Les injections d'hydroxychloroquine ne génèrent a priori pas d'effets dommageables évidents. Le milieu sera enrichi par l'apport de matériel pour construire un nid, et l'hébergement sera assuré en groupe pour permettre aux animaux d'exprimer un comportement social naturel. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de suivre leur bien-être.

10940 Ce projet a pour objectif d'étudier les interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. Plus précisément, nous cherchons à mieux comprendre le rôle de petites vésicules extracellulaires secrétées par les cellules cancéreuses. Elles leur permettent de communiquer avec les cellules normales environnantes, favorisant ainsi la croissance tumorale et l'apparition de métastases. La compréhension de l'interaction entre les vésicules extracellulaires et le microenvironnement tumorale requiert des études dans l'animal. Nous avons choisi de réaliser notre étude dans le poisson zèbre (en remplacement de la souris) pour deux raisons principales : 1/ les tumeurs (mélanomes) et leurs vésicules extracellulaires présentent une grande proximité avec les tumeurs humaines, 2/ les différentes étapes de la progression tumorale peuvent être facilement observées par microscopie non invasive dans l'animal vivant. Des vésicules extracellulaires et des cellules tumorales fluorescentes seront injectées dans le poisson, au stade embryonnaire et au stade jeune adulte. Par ailleurs, nous utiliserons des drogues qui pourraient bloquer l'internalisation ou la fonction des vésicules extracellulaires tumorales. Finalement, nous allons générer des lignées de poissons transgéniques qui nous permettront de visualiser différents éléments du microenvironnement tumoral dans le poisson. La règle des 3R est prise en compte à chaque étape du projet.

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire a été réduit au minimum tout en permettant de réaliser des analyses statistiques pertinentes. De plus, nous utilisons des systèmes d'imagerie qui permettent un suivi longitudinal d'un même animal donc une réduction du nombre total d'animaux nécessaires. Une étude exhaustive des données récentes de la littérature n'a pas permis d'identifier une équipe réalisant des expériences similaires ailleurs dans le monde.

Raffiner : Des points limites ont été établis pour limiter la souffrance animale. Les poissons zèbres adultes sont maintenus en groupe de 10 à 20 par aquarium pour permettre les interactions sociales indispensables à cette espèce. La santé et l'environnement des poissons sont vérifiés quotidiennement (température, PH, conductivité, nitrates). Si un poisson présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs (altération visible, isolement du groupe, difficultés à nager, perte d'appétit etc.), il serait isolé jusqu'à disparition des symptômes. Si les symptômes persistent, il serait alors mis à mort selon la méthode réglementaire appropriée (surdose d'anesthésique).

Remplacement :

Le modèle animal est indispensable à la réalisation de ce projet car il n'existe pas de modèle permettant de reproduire *in vitro* la complexité du microenvironnement tumoral. 3360 poissons seront utilisés dans ce projet.

10941 La probabilité de développer une pathologie donnée est variable d'un individu à un autre, et résulte de l'association complexe de facteurs génétiques et environnementaux. Différents types de facteurs ont été étudiés par le passé et associés à diverses pathologies. En particulier, des relations entre certains gènes, mais aussi certains types de flore microbienne, et certaines pathologies, notamment chroniques inflammatoires (i.e. maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, diabète) ont été mises en évidence. Toutefois, bien qu'un facteur unique soit rarement suffisant pour atteindre l'état pathologique, les études menées jusqu'à présent ont considéré chaque facteur comme un facteur isolé. Nous avons récemment montré que l'exposition au microbiote intestinal tôt dans la vie confère à la souris une résistance au développement de maladies chroniques inflammatoires plus tard dans la vie. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse hygiéniste selon laquelle l'hygiène excessive observée dans les pays développés a conduit à l'augmentation de l'incidence des pathologies auto-immunes et des allergies. Afin d'appréhender la multiplicité et la complexité des facteurs génétiques et environnementaux associés à une vulnérabilité/résistance pathologique, nous proposons d'utiliser des souris du Collaborative Cross (CC), qui modélisent la variabilité génétique humaine, et d'y ajouter des variations à l'exposition aux microbes de la flore connues pour modifier durablement les réponses immunitaires. Dans un premier temps, les profils immunitaires de base de 30 lignées CC seront analysés. Dans un second temps, les souris seront exposées à des stimuli environnementaux délétères (antibiotiques, inflammation, régime gras) afin de déterminer les conditions génétiques et environnementales qui mènent aux pathologies chroniques inflammatoires. 3564 souris adultes seront utilisées sur 5 ans. Quatre procédures expérimentales (1 procédure légère, 3 procédures modérées) permettront d'explorer différents facteurs génétiques et environnementaux de la pathogenèse chronique. Aucune méthode de remplacement n'est envisageable pour l'étude de phénomènes physiologiques aussi complexes. Nous limiterons le nombre de souris utilisées au minimum statistique possible, et planifierons des procédures dont le raffinement méthodologique vise à respecter le bien-être des animaux et réduire tout stress ou souffrance éventuels. L'hébergement collectif dès le jeune âge permettra de réduire le stress et l'agressivité en particulier pour les mâles mais également pour les femelles gestantes. Le fait de peser régulièrement les animaux dès leur jeune âge, d'être manipulé par le même expérimentateur tout au long de la vie, permet également de limiter le stress durant les tests *in vivo*. De plus, la durée individuelle de manipulation sera réduite au minimum. Enfin, l'expérimentateur sera attentif à toute souffrance décelée chez les animaux et des points limites sont définis afin de mettre fin à cette souffrance le cas échéant.

10942 Les stéatoses hépatiques non alcooliques (NAFLD), encore appelées maladies du foie gras sont les maladies du foie les plus fréquentes dans les pays industrialisés associées à l'obésité et au diabète. La stéatose se caractérise par une accumulation de lipides dans le foie. Bien que souvent

sans symptôme, cette accumulation peut générer un état inflammatoire du foie appelée stéato-hépatite non alcoolique (NASH). Ce stade favorise l'apparition d'une cirrhose et contribue au développement d'un cancer du foie (ou carcinome hépatocellulaire-CHC). La compréhension des mécanismes conduisant au développement du foie gras est devenue un enjeu majeur de santé publique.

Notre projet de recherche vise à caractériser les altérations de la division des cellules du foie (hépatocytes) lors de la maladie du foie gras. Nos travaux récents démontrent une altération du contenu en ADN (ploïdie) des hépatocytes dans cette maladie (prélèvement de foie gras chez les patients). Les hépatocytes gras présentent des lésions à l'ADN et expriment de manière importante des protéines qui contrôlent l'amplification de ces lésions (protéines ATM/ATR).

Dans ce projet, nous déterminerons les conséquences de la perte d'expression des protéines ATM/ATR sur la division des hépatocytes gras et sur la formation de tumeurs. Par ailleurs, nos travaux récents ont identifié la protéine LECT2 comme acteur essentiel de l'inflammation et influençant le développement des tumeurs dans le foie. Nous chercherons donc à définir comment Lect2 joue sur le développement des tumeurs. Les procédures expérimentales respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Il est actuellement impossible de reconstituer un système ex-vivo qui récapitule la séquence foie gras (NAFLD/NASH) /cancer du foie (CHC). Le modèle de cancer étudié a été développé chez la souris pour permettre ce type d'étude. Nous projetons d'utiliser, dans les 5 ans des souris mises sous régimes gras qui ne possèdent plus d'expression des protéines ATR, ATM, LECT2. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux et le nombre maximum de souris utilisées sera de 405. Nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. L'étude sera arrêtée si l'expérience initiale invalide l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum* ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. En fonction des expérimentations, de la nourriture et du gel à haute valeur nutritive seront fournis, ainsi que des moyens supplémentaires pour maintenir la température corporelle si le statut des animaux le nécessite. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. Dans le cas où un point limite est atteint avant la fin de l'expérimentation, la mise à mort anticipée de l'animal sera faite. Enfin une veille scientifique continue sera effectuée, évitant ainsi toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

10943 L'Anguille européenne est un poisson migrateur dont les stocks sont en constante diminution depuis les années 80. Un plan de conservation a été mis en place en 2007 au niveau européen et transcrit au niveau national dans le Plan National de Gestion de l'Anguille. Ce plan prévoit notamment des opérations d'alevinage, visant à contribuer à restaurer les stocks. Après l'alevinage, qui consiste au déversement de civelles (ces dernières sont les alevins des anguilles) dans le milieu naturel, des prélèvements réguliers sont réalisés dans ces milieux pour évaluer la survie. Le succès de ces opérations de repeuplement ne peut être évalué que par le biais de marquages des anguilles introduites. Les marqueurs fluorescents permettent de marquer rapidement et par balnéation de grandes quantités de poissons. Ces molécules se combinent au calcium et se fixent durablement dans les structures osseuses. L'euthanasie des poissons est généralement obligatoire pour rechercher la présence de la marque, ce qui reste contestable pour une espèce en danger critique d'extinction. Toutefois, l'un des marqueurs fluorescents, la calcéine, présente la particularité d'être potentiellement détectable sur des poissons vivants, au niveau des nageoires et de la tête, à l'aide d'un détecteur spécifique. La présente étude doit permettre de comparer l'efficacité de deux

protocoles de marquage à la calcéine. Le premier protocole est le choc osmotique. Il consiste à placer les individus dans une solution d'eau salée qui favorise la sortie d'eau des cellules, ce qui, lors du bain qui suit, permet une nouvelle entrée d'eau chargée en calcéine dans les cellules. Le temps de balnéation est court (BC, 7 min) et la solution concentrée (10g/l). Nous la comparons à une balnéation longue dure sans choc osmotique (BL) 3h et la solution de calceine est très diluée (0.5 g/l). Trois expérimentations sont prévues.

L'expérimentation 1 sera faite sur des civelles. La calceine étant sensible à la lumière, il s'agira de comparer le temps de rétention du marquage en fonction de la technique de balnéation et de la luminosité. Des expériences précédentes ont montré que la rétention à 15 jours était correcte avec une balnéation courte. Ainsi, 8 lots de 35 civelles seront soumis à différents traitements (balnéation courte / balnéation longue / contrôle) et soumis à différentes conditions de lumière : faible luminosité, forte luminosité, forte luminosité avec abri) et examinés à 10 jours, 30 jours et 60 jours. L'expérimentation 2 consistera en un pré-essai sur l'anguillette, stade de développement suivant le stade civelle. Comme les civelles de l'expérimentation 1, elles seront soumises à un marquage par balnéation courte et balnéation longue. Il s'agit juste d'établir si la calceine est efficace pour marquer les anguillettes (la pigmentation pourrait modifier la visibilité de la marque). Il n'y aura donc pour ce pré-essai que 3 lots de 3 anguillettes qui seront examinés à 10 jours après marquage. Les expérimentations 1 et 2 seront conduites avec de la calceine dont la qualité est éprouvée. Cependant, il est apparu lors de pré-test que la qualité de rétention de la calcéine pouvait varier en fonction du fabricant. Il est donc proposé de réaliser une 3ème expérimentation afin de tester la qualité de la calceine provenant de 4 fabricants. Quatre lots de 10 civelles seront soumis à une balnéation courte dans des solutions de calcéine provenant de 4 fabricants différents. Un lot contrôle de 10 civelles viendra compléter le dispositif. Ces lots seront examinés à 10 jours.

Au total, 280 civelles seront utilisées dans l'expérimentation 1 (8 lots de 35 individus) : 240 civelles seront sacrifiées pour être examinées et 40 sont prévues en plus en cas de mortalité au cours de l'expérience (relâchées si non utilisées). Pour l'expé 2 : 3 anguillettes par lot sur 3 lots (9 anguillettes), examen à 10 jours. Pour l'expé 3 : 10 civelles sur 5 lots (50 civelles), examen à 10 jours. Tous les individus examinés seront anesthésiés puis euthanasiés avant chaque examen. En effet, la mise au point du protocole nécessite des mesures longues et précises, sous une lumière bleue relativement désagréable pour les individus, même anesthésiés (pré-test). Au total 330 civelles (280 expé 1 + 50 expé 3) et 9 anguillettes sont nécessaires pour mener à bien les 3 expérimentations. Le modèle animal ne peut pas être remplacé car l'étude vise à terme à rechercher la marque sur des anguilles issues du repeuplement (règle des 3 R : Remplacement). La quantification sur animal mort se fera sur un sous-échantillon réduit au maximum : soit 9 anguillettes et 290 à 330 civelles euthanasiées, les civelles surnuméraires (40) pouvant être relâchés en milieu naturel si aucune mortalité accidentelle n'est enregistrée (règle des 3 R : Réduction). Les poissons seront acclimatés à la pisciculture avant le début d'expérience, la température sera contrôlée pendant cette phase, et le comportement des anguilles sera observé lors des différentes étapes du marquage de manière à éviter toute mortalité. La stabulation sera réalisée en circuit ouvert sur eau de rivière décantée. Les interventions humaines consisteront en un passage quotidien pour vérification des paramètres physico-chimiques et de l'absence de problème. L'intervention dans les bassins (nettoyage des bacs, alimentation) ne sera réalisée que tous les 3 jours afin de réduire le stress (règle des 3 R : Raffinement).

10944 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires destinés à être administrés à l'animal de rente, des études de pharmacocinétique sont requises pour justifier du devenir du médicament dans l'organisme (administration-distribution-métabolisation et élimination, ADME).

L'objectif du projet (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez le porc dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs, pour pouvoir établir le profil pharmacocinétique du produit en développement, dans divers tissus, organes et/ou fluides de l'organisme, évaluer la biodisponibilité du produit et/ou déterminer le temps d'attente pour la sécurité du consommateur. Plusieurs études de pharmacocinétique pourront être

requis pour répondre à l'ensemble de ces questions selon l'état d'avancement du développement du produit.

Ces informations réglementaires sont obligatoires et indispensables à la constitution du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du produit final. Ces études de pharmacocinétique doivent être conduites dans l'espèce cible.

L'animal est le porc jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études de pharmacocinétique. Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit et la finalité de l'étude (étude de résidu, évaluation de la biodisponibilité ou du profil pharmacocinétique du produit, bioéquivalence) et dans le respect des textes réglementaires, lignes directrices correspondantes en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 300 animaux.

Le projet (dénommé par la suite protocole cadre) vise à définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez le porc sans compromettre l'atteinte de l'objectif et dans le respect du bien-être animal et des principes de remplacement, de réduction et de raffinement,

- toutes les administrations et prélèvements seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU et aucun d'entre eux n'est susceptible d'induire de dommage ni de souffrance chez l'animal,

- depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,

- les points limites sont toute altération du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit dans les jours suivant la pharmacocinétique ; toute observation laissant présager un début de mal-être est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra examiner l'animal et prendra les décisions adéquates pour sa protection,

- la chronologie des études sera définie de manière à minimiser le nombre d'animaux à utiliser.

Ce projet couvre également le recueil de sang, d'urine ou de fèces dans le but de préparer des matrices témoins requises pour la validation des méthodes de dosage des échantillons générés dans ce projet.

10945 L'utilisation d'extraits végétaux dans l'aliment des volailles connaît un intérêt croissant pour renforcer la robustesse des animaux, pour limiter l'usage des antibiotiques, et pour contribuer à des pratiques d'élevage de volailles plus naturelles. L'objectif du projet est de développer une méthodologie permettant d'évaluer la capacité d'extraits végétaux à renforcer les défenses naturelles des volailles. Une première expérimentation a pour but de développer une méthodologie pour analyser *ex vivo* le sang de poulets stimulé par un extrait bactérien (LPS) en comparaison avec l'analyse du sang des poulets en réponse à une épreuve inflammatoire *in vivo* (n = 12). Une seconde expérimentation consiste à évaluer sur 48 poulets l'effet individuel de 3 extraits choisis pour leurs propriétés anti-oxydante, anti-inflammatoire et immunorégulatrice en comparaison d'un régime contrôle non supplémenté (4 groupes x 12 poulets). Il s'agira d'analyser la réponse des poulets en termes de croissance, de statut oxydant cellulaire, inflammatoire et immunitaire à partir de leurs cellules sanguines. Selon les résultats de la première expérimentation, le sang des poulets sera analysé soit *ex vivo* après stimulation avec du LPS *in vitro*, soit après injection de LPS *in vivo*. Remplacement : Compte-tenu de l'objectif appliqué du projet en santé animale et zootechnie, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro*. Réduction : L'expérimentation ne porte que sur des poulets mâles ; le nombre de 12 animaux par condition est nécessaire et suffisant pour échantillonner suffisamment de sang et tirer des conclusions significatives en tenant compte d'expériences précédentes et de la bibliographie. Douze poussins sont commandés en plus au démarrage pour écarter les poussins à risque pendant la première semaine post éclosion. Au total 72 animaux seront utilisés dans le projet. Raffinement : Les poulets seront élevés au sol sur des copeaux en conditions standard à une densité inférieure au maximum autorisé. Ils seront élevés par groupe de 12 et auront accès à l'aliment, l'eau de boisson *ad libitum* et la possibilité d'explorer des objets divers. Ils seront visités deux fois par jour afin de détecter précocement tout problème.

Toute manifestation de symptômes comportementaux persistants définis par un point limite entraînera le retrait de l'animal de l'expérimentation.

10946 En Europe et dans le monde, l'utilisation de substances chimiques est soumise à diverses directives et règlements (directive produits phytosanitaires, règlements biocides et REACH...). Leurs exigences requièrent notamment la réalisation de tests d'écotoxicité sur les animaux. Pour les organismes marins, la commission OSPAR a publié ses recommandations dans le document "Protocols on Methods for the Testing of Chemicals Used in the Offshore Oil Industry" en 2005". Celles-ci s'appuient en grande partie sur le protocole d'essai décrit dans la ligne directrice de l'OCDE 203 (1992) et doit être appliqué sur l'espèce marine *Scophthalmus maximus* (poisson Turbot).

La ligne directrice définit des recommandations d'essai afin d'évaluer les effets toxiques aigus d'une substance chimique sur l'organisme testé : les poissons sont exposés à une gamme de concentrations croissantes de la substance, les effets sont comparés à un lot témoin non exposé (un aquarium de 20L environ par concentration). La ligne directrice recommande d'utiliser au minimum 7 poissons pour chaque concentration d'essai et pour les témoins. Les 2 modalités d'essai suivantes sont envisageables :

- test "limite" : il est réalisable si des données d'écotoxicité sur des espèces algales marines et de crustacés marins sont disponibles. Ce test emploie alors 14 poissons (7 organismes témoins et 7 organismes exposés à une seule concentration de la substance chimique).

-test "dose-réponse" : si aucune donnée n'est disponible ou si aucune toxicité n'a été observée sur d'autres espèces marines, il convient de procéder à un test dose réponse. Au moins 5 concentrations sont alors testées, soient un minimum de 42 poissons. Un test préliminaire est généralement réalisé avant le test définitif afin de choisir la gamme de concentration appropriée. Pour ce test préliminaire le laboratoire réduit à 5 au lieu de 7 le nombre de poissons utilisés par concentration, soient 30 poissons au total. Un test dose-réponse emploie donc 72 poissons minimum. L'expérience du laboratoire peut dans certains cas permettre de réaliser uniquement le test définitif et donc de diminuer le nombre d'individus testés.

De même, une équipe d'experts écotoxicologue en charge des dossiers réglementaires réalise des recherches bibliographiques afin de vérifier la disponibilité de données de toxicité qui permettrait de diminuer le nombre d'organismes utilisés (cas du test limite) voire de ne pas réaliser de test si les données sont jugées satisfaisantes.

Nous envisageons la réalisation annuelle de 5 tests dose-réponse (correspondant à 5 substances) soit un total de 1800 poissons sur la durée du projet (5 ans).

A la fin de chaque test (96h), tous les individus survivants témoins inclus sont en principe euthanasiés en les plongeant dans un bain léthal d'anesthésiant, car ils subissent potentiellement un stress qui pourrait les rendre plus sensibles lors d'une utilisation ultérieure et donc fausser les résultats. Cependant dans le cadre des 3 R, nous nous gardons la possibilité de réutiliser les lots témoins pour des essais préliminaires par exemple : si aucun test n'est prévu la semaine qui suit la fin d'un test, les témoins sont réintroduits dans leur aquarium d'origine. Dans le cas contraire, ils sont isolés afin d'éviter leur réutilisation la semaine suivante.

Le remplacement n'est pas possible car la réglementation impose un test sur poisson, les modélisations n'étant pas acceptées. Le nombre d'animaux utilisés par test est également cadré par la ligne directrice OCDE 203. Néanmoins, dans le cas où une absence de toxicité serait révélée lors de la première étape du test préliminaire, la seconde étape sera réalisée selon les conditions d'un test dit "limite" qui emploie un nombre réduit d'individus.

Le raffinement est assuré par la pose de poster d'ornement figurant le milieu de vie naturel de l'espèce sur la face inférieure à l'extérieur des aquariums. L'introduction d'objet dans les aquariums est interdite car il faut éviter les interactions avec la substance chimique à tester. Tous les aquariums sont situés dans un laboratoire dédié. L'environnement d'essai (photopériode, température et oxygénation) est tel que les animaux sont dans des conditions de vie optimales propres à l'espèce. La qualité de l'eau est suivie à minima une fois par semaine avec contrôle des paramètres suivants : pH, oxygène dissous, teneurs en ammonium, nitrates et nitrites.

10947 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique provoque fréquemment des déficits moteurs et cognitifs sévères. La majorité des patients AVC présentant des troubles moteurs et cognitifs modérés (mais handicapants) ne sont pas pris en charge en centre de rééducation et sont donc exposés à des complications motrices, cardiovasculaires et métaboliques, affectant leur indépendance sur le long terme. Pour permettre aux patients de retrouver une indépendance acceptable, il paraît indispensable, d'optimiser la rééducation dont l'exercice physique fait partie intégrante. Cependant, bien que fortement recommandés, les exercices d'endurance restent encore trop peu utilisés car ils peuvent être contraignants, peu ludiques (peu motivants) et demandent un volume de travail important. Ainsi, peu de patients trouvent du temps à consacrer au travail d'endurance. De plus, le type d'entraînement d'endurance à privilégier reste inconnu et peu étudié à ce jour. L'objectif de ce projet est de définir quelles sont les stratégies d'endurance les plus appropriées chez le rat ayant subi une ischémie cérébrale, c'est-à-dire, celles qui assurent une récupération fonctionnelle rapide, efficace, sécurisante et qui induisent un gain de temps significatif par séance. Pour atteindre cet objectif, l'efficacité des programmes d'endurance sera déterminée à partir de mesures comportementales (tests sensorimoteurs et cognitifs), d'un test d'effort incrémental sur tapis roulant et de mesures immunohistochimiques.

La règle des 3R sera respectée dans ce projet :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle de substitution *in vitro* pour étudier l'impact d'un entraînement d'endurance post-ischémie cérébrale. Le rat est un modèle de choix car les adaptations physiologiques au niveau musculaire et cérébral induit par l'entraînement sont proches de ceux qui sont observées chez l'Homme.

Réduction : Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux pour chaque groupe, nécessaire à la réalisation d'un test statistique paramétrique, soit un total de 128 rats Sprague Dawley, mâles et femelles. Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (visualisées par une augmentation du rythme respiratoire au niveau des flancs de l'animal), si le rat est prostré ou en retrait, si ses poils sont hérissés.

Raffinement : Les méthodes utilisées sont soit non invasives soit sans réveil. Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subie par les rats afin d'obtenir des données qui soient le moins biaisées possible par le "mal être" de l'animal. Par exemple, l'environnement des cages sera enrichi par la présence d'objets afin de réduire l'ennui des animaux. La nourriture (humidifiée) sera à disposition de l'animal directement dans la cage après l'ischémie cérébrale.

10948 L'accident vasculaire cérébral (AVC) touche environ 6 millions de personnes en Europe, avec 1,1 million de nouveaux cas chaque année. C'est la 1^{ère} cause de morbidité puisque plus de 50% des patients garderont un handicap, et 25% développeront une démence. Le nombre de patients tend vers une augmentation due à la population vieillissante et aux fortes hausses du diabète et de l'obésité, atteignant des niveaux épidémiques, ainsi que de l'hypertension artérielle qui reste incomplètement traitée. Le seul traitement disponible pour traiter l'AVC est la reperfusion de l'artère occluse qui permet de détruire le caillot sanguin obstruant l'artère (pharmacologique par rtPA et mécanique par thrombectomie). Malheureusement, ces traitements ne peuvent être administrés que lors des 4,5 (pour le rtPA) et jusqu'aux 8 premières heures (pour la thrombectomie) suivant un AVC, limitant considérablement leur utilisation. De ce fait, seulement 5% des patients peuvent en bénéficier. Un traitement efficace, s'adressant à une plus importante population de patients, administré au-delà de la fenêtre thérapeutique actuelle, et qui réduirait la mortalité et le handicap sur le long terme est donc indispensable.

C'est dans ce contexte que s'est développée la recherche en thérapie cellulaire. En effet, les « cellules souches adultes » en condition hypoxique, améliorent le pronostic fonctionnel aussi bien dans les études expérimentales chez l'animal qu'en clinique humaine et diminuent parfois le volume de l'infarctus. Les mécanismes ne sont néanmoins pas élucidés car si ces cellules souches adultes (ou progéniteurs) ont la capacité de se différencier en cellules du tissu receveur, elles s'intègrent cependant très peu au tissu et semblent plutôt produire des facteurs trophiques qui participent à la nutrition et à la survie du tissu receveur, stimulant fortement les mécanismes de réparation

endogène du cerveau. Les cellules souches mésenchymateuses sont facilement dérivées à partir de multiples sources incluant le tissu adipocytaire (AD-MSC), qui comprend du tissu conjonctif de soutien et des cellules graisseuses ou adipocytes. L'intérêt de ces cellules est qu'elles présentent une faible immunogénicité, c'est-à-dire qu'elles provoquent peu de réponse immunitaire du receveur lorsqu'elles sont transplantées, après une greffe allogénique, c'est à dire lorsque des cellules proviennent d'un donneur qui est différent du receveur et lui sont greffées. Le risque de rejet avec ces cellules est faible permettant une utilisation sûre de celles-ci. L'administration intraveineuse (IV) de ces cellules AD-MSC est non invasive et facile. Elle n'est toutefois pas sans risque du fait de la distribution systémique de ces cellules étant donné la voie choisie.

Les objectifs du projet sont 1) utiliser la thérapie cellulaire, afin de diminuer le volume des infarctus cérébraux et le déficit neurologique, de prévenir la démence post-AVC, et d'en étudier les mécanismes, 2) prendre en compte les facteurs de risques vasculaire que sont le diabète et l'hypertension artérielle, 3) chez des souris et des rats mâles et femelles, 4) administrer les AD-MSC en deux temps, un temps précoce et un temps tardif, afin d'évaluer la persistance de l'effet en augmentant la fenêtre thérapeutique.

Ce projet est un projet collaboratif. Les différents axes du projet dans notre équipe impliquent 510 souris mâles pour l'ensemble des protocoles expérimentaux pour une période de 5 ans. Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Chaque partenaire a en charge un aspect particulier du projet (étude de l'influence du sexe, de l'âge, de l'espèce).

Dans cette étude nous utiliserons un modèle d'ischémie cérébrale chez des souris diabétiques ou hypertendus, traitées ou non par la thérapie cellulaire.

Un soin particulier sera apporté au raffinement des traitements contre la douleur avant et après les procédures chirurgicales, et l'animal sera surveillé jusqu'à la fin de l'étude. Une analgésie par buprénorphine (0.1mg/kg en sous cutané) sera réalisée 30 min avant le début de la procédure chirurgicale et sera renouvelée/12h pendant 48h. La souris est surveillée en couveuse et remise en cage (5 souris/ cage). Au cas où les douleurs évaluées sur l'anorexie, une perte de poids > 20%, une altération de l'apparence physique tels le grattage, un poil terne...) et du comportement tels un repli dans un coin, le poil hérissé...), persisteraient malgré les procédures entreprises, l'animal sera mis à mort. Les cellules AD-MSC seront administrées 48h ou 7 jours après l'AVC.

Une réponse systémique est induite par l'AVC et va durer plusieurs semaines. C'est pourquoi, après la mise à mort des animaux, le sang et le cerveau sont prélevés et stockés pour les analyses cellulaires (typage des cellules), biochimiques et histologiques et recherche de biomarqueurs de la réponse à l'administration de cellules souches.

La demande de ce projet d'expérimentation animale est justifiée par le fait qu'aucune approche *in vitro* ne permet d'évaluer le déficit sensori-moteur ou la démence induits par l'AVC au cours du temps. Ce modèle d'AVC n'est pas remplaçable.

10949 Les bioprothèses valvulaires d'origine animale ont constitué un progrès technique fondamental en chirurgie cardiaque. La mise au point des techniques pour leur préservation, qu'il s'agisse de valvules porcines aortiques ou de péricarde bovin, a transformé les indications des remplacements valvulaires en clinique humaine. De nombreuses études ont démontré les avantages significatifs des bioprothèses valvulaires par rapport aux prothèses mécaniques, en particulier la diminution du risque de maladie thromboembolique et donc l'absence d'utilisation d'anticoagulants avec une morbidité et une mortalité per- et post-opératoire moindres. Néanmoins, une des limitations essentielles à l'utilisation des bioprothèses valvulaires est la survenue plus ou moins tardive de calcifications, inconvénient majeur nécessitant alors un nouveau remplacement valvulaire.

Le but de cette recherche est de modifier les traitements de la bioprothèse, afin de diminuer les calcifications qui apparaissent après implantation chez l'homme jeune, et d'améliorer la durée de leur fonctionnement. Ces nouveaux traitements seront testés et analysés après implantation en sous-cutanée chez des ratons de 12 jours.

Afin d'éviter toute souffrance, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec une analgésie pré- et postopératoire. Des points-limites ont soigneusement été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Pour ce projet, 576 rats seront nécessaires pour une durée de 5 ans. La diversité des traitements nécessite un grand nombre de groupes tests et chaque groupe doit contenir un grand nombre d'échantillons nécessaire pour nos études statistiques. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque raton recevra 4 disques de tissu péricardique à tester.

L'étude de la prévention de la calcification des bioprothèses valvulaire nécessite le recours aux animaux. Il n'existe pas de modèle *in vitro* capable de réunir tous les facteurs biologiques, immunologiques ou mécaniques responsables de la calcification des bioprothèses

A l'issue de ce projet, il sera possible de définir le traitement optimal contre la calcification et la dégénérescence des bioprothèses valvulaires et d'optimiser les transplantations d'organes artificiels en chirurgie cardiaque.

10950 En aquaculture, une des voies pour promouvoir une filière durable consiste à diversifier la production par la domestication de nouvelles espèces. La domestication est définie comme le processus par lequel une population s'adapte à l'homme et à l'environnement captif. Toutefois, les premières phases d'élevage d'une nouvelle espèce restent difficiles, reposent sur des processus coûteux et conduisent souvent à un échec. Or, le potentiel de domestication et l'attractivité socio-économique peuvent être variables entre groupes de populations appartenant à une même espèce (intraspécifique). Ces groupes peuvent présenter des spécificités locales et un potentiel pour l'aquaculture plus grand (ex : forte croissance, meilleure résistance aux maladies, faible agressivité). Ce potentiel de domestication doit être évalué à partir d'une approche intégrant plusieurs fonctions biologiques (multifonction). En effet, il est nécessaire de considérer des indicateurs issus de différentes fonctions biologiques et de ne pas se focaliser par exemple sur les performances de croissance seules. Des potentiels différentiels ont déjà été démontrés chez plusieurs poissons comme le saumon atlantique ou le bar européen où des populations d'origines géographiques différentes présentent des différences de croissance, de survie ou de morphologie. Une des solutions pour améliorer les premiers stades de domestication pourrait donc se trouver dans l'exploitation de la diversité intraspécifique. Notre étude se focalisera sur la perche commune qui présente un intérêt socio-économique. Différents points de blocage existent à l'heure actuelle en conditions d'élevage : comportement (agressivité, cannibalisme), faible croissance ou encore sensibilité au stress (mortalités). Une approche multifonction sera menée pour pouvoir évaluer les différences de potentiels entre groupes de populations génétiquement différenciés pour les premiers stades de vie. Cela nécessitera d'évaluer la croissance et la survie par un suivi et des prélèvements réguliers d'individus sans douleur ou procédure spécifique. En revanche, il sera aussi nécessaire d'évaluer des indicateurs comportementaux et des paramètres liés à l'état physiologique des individus, ce qui fait l'objet de la saisine ci-présente.

Deux groupes de populations sauvages génétiquement différenciés ont été choisis à partir d'une étude génétique réalisée précédemment. L'étude ciblera les premiers stades de vie, de l'éclosion à deux mois post-éclosion (phase nurserie). Pour chacun de ces groupes, trois populations vont être considérées afin de prendre en compte la variabilité intergroupe et intragroupe. L'objectif de cette expérimentation est d'évaluer si ces groupes de populations génétiquement différenciés présentent des performances comportementales et physiologiques différentes dans un milieu d'élevage imposé. Améliorer l'élevage de la perche passe notamment par l'identification de populations qui sont plus grégaires et donc moins agressives mais aussi moins sensibles au stress, justifiant l'intérêt du volet comportemental de cette étude. De plus, l'état physiologique pouvant être particulièrement impacté en situation d'élevage par des facteurs de stress, nous souhaitons approfondir l'étude de l'impact du stress à travers l'évaluation de paramètres immunitaires et physiologique post-stress pour identifier des groupes potentiellement moins sensibles au stress.

Les conditions d'élevage ont été fixées pour placer les individus dans les meilleures conditions possibles. Le nombre de poissons (n=2520) a été calculé afin d'obtenir une puissance statistique a priori suffisante pour espérer obtenir un résultat significatif tout en respectant la règle des 3R

(réduction). Deux procédures expérimentales seront conduites. Pour l'évaluation de la structure sociale et de la sensibilité comportementale au stress (procédure 1), 10 individus seront utilisés afin de pouvoir évaluer les interactions interindividuelles ce qui nécessite un groupe suffisamment grand pour qu'une structure sociale apparaisse. Le réplica considéré ici est le groupe de 10 individus. En comportement, un nombre de réplicas (avec 10 individus par réplica) suffisamment élevé ($n=9$ par population ce qui correspond à un total de 90 individus étudiés par population) est nécessaire pour obtenir des résultats solides. Deux âges différents seront considérés étant donné que cette structure de groupe peut évoluer avec l'âge des individus. Pour les tests liés à la résistance au stress et au statut immunitaire (procédure 2), il est nécessaire d'avoir au moins dix individus pour prendre en compte la variabilité physiologique interindividuelle et comparer les résultats aux données comportementales. Différents points de prélèvement (5min, 30min et 1h) seront effectués pour chaque paramètre étudié (cortisol et paramètres immunitaires). Un minimum statistique de trois réplicas (trois groupes de 10 individus) est nécessaire par point de prélèvement pour prendre en compte la variabilité intra-populationnelle. Dans ces évaluations des performances entre groupes de populations, il n'est pas possible de remplacer les animaux par des modèles cellulaires ou moléculaires. En effet, l'objectif est de déterminer si des performances différentes apparaissent entre les populations et celles-ci (inconnues) ne peuvent pas être prédites ou analysées *in vitro*. Au cours de l'ensemble de la phase expérimentale (phase d'élevage, tests), l'apparition de points limites (maladies, changement de l'activité de nage, du comportement alimentaire) ou toute souffrance conduira à l'exclusion de l'individu de l'expérience (raffinement).

10951 Les notions de bien-être et de gestion du stress sont essentielles à prendre en compte en élevage à l'heure actuelle. Des connaissances partielles existent chez le poisson d'élevage mais il est important d'apporter de nouvelles connaissances, notamment sur les moyens/outils de gestion du stress. Le poisson d'élevage connaît différentes manipulations au cours de sa vie (tris, transports, vaccination, abattage) pouvant induire du stress et fragiliser le poisson vis à vis d'agents pathogènes et/ou avoir un effet sur la qualité de la chair pour le produit commercialisé. Cette étude vise à tester l'effet d'un additif alimentaire sur la gestion du stress aigu chez la truite arc en ciel *Oncorhynchus mykiss*. Dans cette étude, 560 truites type portion de 250 ± 10 g seront réparties dans 18 bassins expérimentaux selon les traitements suivants : 1 lot témoin sans additif, 1 lot témoin avec additif, 2 lots à stresser et à nourrir sans additif et 2 lots à stresser et à nourrir avec additif. La densité initiale pour chaque bassin sera de l'ordre de 35-40kg.m³. Au cours de l'expérience, les poissons seront nourris à satiété apparente. Après 7 jours d'élevage, les lots dupliqués seront fusionnés afin d'induire un stress lié à l'augmentation de la densité d'élevage (ici 70-80kg.m³) et aux manipulations (tri, transport) que connaissent les animaux en élevage. Des prélèvements sanguins seront réalisés sur 6 individus échantillonnés au hasard dans chaque bassin suivant la fréquence de 0 (avant le stress), 0.5, 2, et 24h. Le taux de cortisol plasmatique des individus échantillonnés sera déterminé en suivant la technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). De plus les paramètres de croissance tels que le taux de conversion alimentaire (FCR), le taux de croissance spécifique (SGR) et le taux de survie (S) seront également calculés et analysés. Le nombre d'individus, les paramètres d'élevage et les méthodes statistiques d'analyses prévus pour cette expérience respectent le principe de réduction, de remplacement et de raffinement. Pendant l'étude, les animaux sont observés deux fois par jour. Le raffinement est apporté par la mise en place d'un bullage dans les bassins, créant un mouvement, et par la mise en place de tunnel/cachette dans chaque bac. Cette étude permettra d'apporter des connaissances sur le stress aigu du poisson type truite arc en ciel et sur la gestion de ce stress via un additif alimentaire.

10952 Dans le but de faciliter l'administration par voie orale chez le chat d'un médicament ou d'un nutraceutique en cours de développement, la prise volontaire, et donc l'appétence du produit, est primordiale. Un produit qui doit être mélangé à la nourriture n'est pas considéré appétent. L'appétence des produits peut être améliorée par l'ajout de composés odorants, bien que ce ne soit pas toujours nécessaire, ce qui se traduit par une meilleure prise spontanée par les animaux et facilite ainsi la bonne observance du traitement par le propriétaire. Pour pouvoir revendiquer

l'acceptance/appétence (ou palatabilité) du produit, des études appropriées sont requises puisque la référence à la seule composition n'est pas suffisante pour garantir l'appétence. En effet, la forme, la texture, la taille, la dureté ou encore l'odeur du produit peut influencer sur la bonne acceptabilité du produit par l'animal et donc sa consommation spontanée.

La prise spontanée peut être évaluée sur une prise unique ou sur des prises répétées, l'étude sera alors dénommée acceptance ou appétence respectivement.

L'objectif du projet (dénommé par la suite protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études d'acceptance/appétence chez le chat dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs, pour pouvoir évaluer la consommation spontanée par l'animal du produit en développement. Plusieurs études d'acceptance/appétence pourront être requises pour répondre à l'ensemble de ces questions selon l'état d'avancement du développement du produit, selon le schéma posologique envisagé, avec une présentation unique ou des présentations répétées du produit au même animal.

Ces informations réglementaires sont obligatoires et indispensables pour revendiquer l'acceptance/appétence du produit. Ces études d'acceptance/appétence doivent être conduites dans l'espèce cible.

L'espèce cible est le chat, jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études d'appétence. Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon le schéma posologique (administration unique ou sur le long terme) du produit testé, et selon les exigences des textes réglementaires et les recommandations des lignes directrices correspondantes en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 300 animaux sur la durée du projet.

L'acceptance/appétence étant évaluée par la prise spontanée du produit à tester par l'animal, aucun traitement n'est imposé à ce dernier,

- toutes les présentations de produits seront réalisées conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU et aucun produit n'est susceptible d'induire de dommage ni de souffrance chez l'animal,
- depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,
- les points limites sont tout changement du comportement ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit ou de poids dans les jours suivant la consommation du produit ; toute observation laissant présager un début de mal-être est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour protéger l'animal,
- les animaux sont hébergés à demeure pendant 4 à 5 ans et pourront participer plusieurs fois aux procédures décrites dans le présent projet. La décision de réutiliser un animal dans une procédure expérimentale sera prise par le vétérinaire si les conditions de l'article R2014-1 13 du Code rural et de la pêche maritime sont remplies.

10953 La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie pulmonaire fatale et sans traitement. Il existe deux modifications du poumon chez ces patients. La première est un emphysème pulmonaire, c'est-à-dire une destruction des alvéoles, qui sont responsables des échanges gazeux dans le poumon. La seconde est une bronchite chronique, c'est-à-dire une inflammation des bronches entraînant une hypersécrétion de mucus. Ces deux modifications entraînent chez les patients des difficultés respiratoires (essoufflement) ainsi qu'une toux chronique. Notre laboratoire a montré une accumulation de cellules dites « sénescents » chez les patients BPCO. Ces cellules sont incapables de proliférer et de communiquer correctement avec leurs voisines, mais restent présentes dans le poumon. Leur accumulation a donc pour effet d'empêcher le renouvellement normal du poumon, et on pense que leur incapacité à communiquer normalement avec les autres cellules pourrait causer une inflammation voire même l'apparition de tumeur. Il est donc crucial de comprendre le rôle exact de ces cellules dans les maladies pulmonaires comme la BPCO.

Nous avons également mis en évidence le rôle d'une protéine nommée PLA2R1 dans la sénescence cellulaire. En effet, si on augmente la quantité de PLA2R1 dans des cellules, on obtient plus de cellules sénescents. Il existe des molécules permettant de contrer les effets de PLA2R1 en agissant sur ces cibles : le ruxolitinib, le XCT790, et le KH064.

Dans cette étude nous cherchons à répondre aux questions suivantes :

1- L'augmentation de PLA2R1 dans le poumon des souris entraîne-t-elle une augmentation de la sénescence cellulaire ?

2- Cette sénescence cellulaire permet-elle de mimer chez la souris un aspect pulmonaire proche de celui des patients BPCO (emphysème et inflammation pulmonaire, épaississement bronchique) ?

3- Des traitements inhibant PLA2R1 permettent-ils de protéger le poumon des souris ?

Pour créer l'augmentation de PLA2R1 dans le poumon de souris, un virus contenant PLA2R1 est injecté dans le poumon des souris.

Pour inhiber PLA2R1, des groupes de souris recevront du ruxolitinib, du XCT790 ou du KH064, qui pourraient alors être envisagés comme traitement chez les patients BPCO. Un groupe de souris recevra un antioxydant, appelé NAC, protecteur dans d'autres modèles d'emphysème.

Deux types de souris seront utilisés : des souris non transgéniques, et des souris génétiquement modifiées nommées p16-luc. Chez ces dernières, les cellules sénescents sont bioluminescentes, ce qui permet de les observer et de les quantifier par imagerie chez des souris vivantes.

Dans notre étude, l'utilisation de la souris est indispensable car il s'agit d'une pathologie complexe faisant intervenir plusieurs types de cellules à la fois. Elle ne peut donc pas être conduite sur des cellules en culture.

En réduisant au minimum le nombre de souris tout en garantissant l'obtention de résultats robustes scientifiquement et statistiquement, nous utiliserons 192 souris. L'utilisation d'imagerie permet de suivre des groupes de souris dans le temps ce qui permet une diminution du nombre d'animaux. Les techniques utilisées et le mode d'hébergement des souris ont été raffinées afin de maintenir le bien-être des souris tout au long de l'étude. Une partie de l'étude sera réalisée sur des cellules en culture (*in vitro*) issues de ces souris, ce qui entre dans l'objectif de remplacement des animaux.

10954 En France, le cancer de la prostate représente la 2ème cause de mortalité par cancer chez l'homme (11 % des décès par cancer) ce qui le classe au 1er rang des priorités thérapeutiques.

Principalement 2 approches sont utilisées pour mimer les événements biologiques associés aux processus de cancer : une approche *in vitro*, basée sur l'utilisation de lignées cellulaires ou de cellules cancéreuses isolées et des approches *in vivo*, basées sur l'utilisation d'animaux de laboratoire, chez lesquels des tumeurs cancéreuses sont transplantées. Les modèles *in vitro* ne recréent ni la diversité de l'environnement des tumeurs, ni la difficulté pour une molécule testée d'atteindre les cellules cibles. De plus, il est impossible d'étudier le développement métastatique dans ces modèles. Ces limitations rendent donc incontournables le recours à l'expérimentation animale pour tester l'efficacité de nouvelles molécules antitumorales.

L'objectif de ce projet est de poursuivre nos travaux concernant les modèles de xénogreffe de tumeurs prostatiques, chez la souris Nude, pour permettre l'évaluation de nouvelles molécules anticancéreuses. 2 modèles seront utilisés :

- Modèle sous cutanée qui n'induit pas de développement métastatique donc moins représentatif de la physiopathologie humaine mais qui est une approche moins sévère et qui a eu encore récemment le mérite de mettre en évidence l'activité de molécules devenues par la suite des médicaments.

- Modèle orthotopique (intra-prostatique) qui est implanté au niveau de leur site anatomique d'origine permettant à la tumeur d'acquies un comportement invasif plus proche de la réalité clinique et de générer des métastases à distance (ganglions lymphatiques, foie et pancréas). Ce modèle, plus sévère, est néanmoins plus proche de la physiopathologie cancéreuse et est donc plus prédictif.

Le nombre de souris Nude nécessaire à cette étude est : 200 souris pour le modèle sous cutané et 400 souris pour le modèle orthotopique en raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

Les interventions chirurgicales (injections de cellules en intra-prostatique) seront effectuées sous anesthésie générale et la température corporelle de l'animal sera maintenue à l'aide de tapis chauffant. La croissance tumorale seront suivis au cours du temps (5 à 7 semaines) par des techniques non-invasives : mesure au caliper (modèle sous-cutané) ou par imagerie de luminescence (modèle orthotopique). L'utilisation de ces techniques non-invasives permet d'observer au cours du temps un seul animal simplement anesthésié, là où l'information devait être obtenue par euthanasie et autopsie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux. De plus, afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement sera rajouté aux animaux. A savoir un igloo permettant aux animaux de faire une nidation et un morceau en bois de tremble. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours, le suivi étant assuré par les zootechniciens certifiés de l'animalerie le week-end.

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

10955 1. Objectif scientifique du projet

TLR3 est un récepteur de l'immunité innée présent dans la plupart des cellules immunitaires et épithéliales.

Dans les cellules cancéreuses qui expriment toujours le récepteur (cancer du sein, cancer du poumon, etc), l'activation du récepteur entraîne à la fois une inflammation mais aussi la mort de ces cellules cancéreuses.

La possibilité de ciblage thérapeutique de TLR3 dans les cancers a été confirmée par une étude rétrospective démontrant que seules les patientes dont le cancer du sein exprimait TLR3 avaient répondu favorablement à un traitement avec un ligand de TLR3.

Malgré leur activité adjuvante en vaccination, aucune molécule cible de TLR3 n'a à ce jour obtenu l'autorisation de mise sur le marché, en raison d'effets toxiques ou de manque d'efficacité, et d'homogénéité structurelle.

De nouveaux ligands parfaitement définis structurellement et reproductibles ont récemment été identifiés. La preuve de concept *in vitro* de l'effet pro-apoptotique de ces molécules sur des cellules tumorales a été apporté.

L'objectif de ces expériences est d'étudier la tolérance, et la biodistribution *in vivo* de ces ligands.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Le projet a pour but de développer une nouvelle molécule pro-apoptotique et immunothérapeutique ciblant les cancers épithéliaux TLR3. Ces résultats s'inscrivent dans le cadre du développement d'une application thérapeutique utilisable chez les patients.

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

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée ; Réduction du nombre d'animaux, sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Raffinement : Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux minimum 2 fois par semaine, permettra d'éviter la souffrance des animaux. De plus tous les gestes pouvant provoquer un stress ou de la souffrance chez l'animal, seront réalisés sous anesthésie. Ces procédures ne requièrent pas l'usage d'analgésique. Remplacement, lors de la réalisation des protocoles, de nombreuses analyses *in vitro* seront réalisées sur les différents prélèvements pour documenter et obtenir le maximum d'informations. Seul un modèle *in vivo* nous permettra la tolérance et la biodistribution de ces molécules.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Au total, 146 souris seront incluses dans ce projet pendant les 3 ans à venir.

10956 L'arthrose est une maladie de l'ensemble de l'articulation détruisant le cartilage, altérant l'os sur lequel il repose, et entraînant une inflammation de la synoviale. Ces modifications entraînent chez le patient une incapacité motrice ainsi que des douleurs articulaires chroniques invalidantes et, dans certains cas, des troubles cognitifs notamment de la mémoire, ainsi que de l'humeur (anxiété, dépression). Plusieurs modèles précliniques chez la souris permettent de reproduire ces symptômes observés chez l'humain, notamment la déstabilisation du ménisque (modèle d'une arthrose traumatique) ou l'injection de monoiodoacetate (MIA ; modèle d'une arthrose à composante inflammatoire). Ces différents modèles sont actuellement utilisés pour évaluer si les médicaments dits « anti-arthrosiques » sont efficaces sur tout type d'arthrose, ou plutôt sur des arthroses à forte composante inflammatoire, ou des arthroses ayant pour origine un traumatisme mécanique.

Nos travaux récents ont montré que des mécanismes épigénétiques, affectant l'expression des gènes sans modifier l'ADN, seraient impliqués dans l'arthrose. De manière intéressante, la régulation de certains de ces processus par des molécules appelées « épi-médicaments », présente des propriétés anti-inflammatoires, anti-cataboliques et pro-anaboliques *in vitro*, suggérant que ces agents pharmacologiques pourraient freiner le développement de l'arthrose *in vivo*. En d'autres termes, ces épi-médicaments pourraient potentiellement freiner la destruction du cartilage et réduire le handicap associé à cette pathologie.

Les modèles cellulaires étant incomplets pour ce qui est d'étudier le développement de l'arthrose car dépourvus d'interaction avec la matrice extracellulaire, nous nous proposons d'étudier l'effet des molécules identifiées *in vitro* dans ces modèles d'arthrose *in vivo*.

L'effet des molécules sera testé sur : i) un modèle chirurgical d'arthrose induite chez des souris mâles âgées de 10 semaines (ce qui correspond à la fin de la croissance) par déstabilisation de l'articulation induite par méniscectomie mimant une arthrose d'origine traumatique/mécanique, et ii) sur un modèle chimique d'arthrose induite par injection intraarticulaire de MIA, mimant une arthrose à forte composante inflammatoire.

Nous étudierons l'effet de deux épi-médicaments ayant montré des effets positifs dans nos modèles cellulaires : l'un actuellement en développement clinique pour le traitement des cancers, l'autre non encore utilisé en clinique mais donnant de meilleurs résultats *in vitro*. Des tests comportementaux visant à étudier la douleur, la mobilité et les fonctions cognitives et émotionnelles seront réalisés en longitudinal après l'induction de l'arthrose. Des tests histologiques seront également réalisés en fin de protocole afin d'évaluer les destructions tissulaires au niveau de l'articulation et les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Cette étude est basée sur l'expérimentation animale et prend en compte la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-après.

Le modèle murin combine les avantages d'intégrer les différents tissus de l'articulation avec les possibilités de modification génétique. Les données *in vivo* sont donc indispensables à la validation des propriétés anti-arthrosiques de nouvelles molécules. Par ailleurs, les procédures comportementales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité visant à étudier les aspects fonctionnels de l'arthrose que sont la douleur chronique, l'altération de la mobilité et des processus cognitifs et émotionnels. De fait, les expériences ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Concernant la réduction du nombre final d'animaux nécessaires, nous avons fait un calcul statistique afin d'estimer le minimum d'animaux nécessaire à l'étude. Le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de ce projet est de 420.

Concernant le raffinement des conditions expérimentales, l'état de chaque souris sera contrôlé quotidiennement afin de s'assurer de son bien-être. L'animal sera immédiatement soigné s'il présente des blessures légères. En revanche si un animal montrait des signes cliniques de

souffrance celui-ci serait immédiatement retiré du protocole (d'après le point limite décrit pour le projet).

10957 Le risque de mort subite chez les patients épileptiques (SUDEP) est trois fois plus élevé que chez les personnes saines. Il existe un modèle idéal de SUDEP chez la souris correspondant à une crise épileptique induite par un stimulus sonore et possiblement suivie du décès (crise audiogène ou AGS pour « AudioGenic Seizures » en anglais). Seulement, seules quelques lignées de souris sont sensibles à la crise audiogène. La plupart des recherches faisant intervenir le modèle AGS sont développées avec les lignées de souris DBA/2 ou DBA/1. Malheureusement cette lignée s'avère physiquement frêle et elle est incompatible avec la pose d'électrodes pour suivre l'activité cardiaque ou respiratoire par exemple. Nous avons identifié une lignée tout autant sensible à l'AGS mais avec une corpulence compatible avec la pose d'électrodes.

L'inconvénient sous-jacent au modèle AGS réside dans le fait que la pénétrance du phénotype (le caractère systématique de la présence du phénotype suite à une stimulation) n'est pas assurée. Il a été observé avec les souris DBA/2 et DBA/1, que si on leur applique le stimulus AGS pendant 4-5 jours consécutifs entre 21 et 30 jours d'âge, on crée un effet kindling qui fera que par la suite, la souris répondra systématiquement par une crise audiogène à l'âge adulte. Ce phénomène d'embrasement est appelé "priming" pour l'AGS. Plus le début du priming est proche du 21^{ème} jour, plus l'effet sera solide. Notre projet consiste à évaluer si notre lignée nouvellement identifiée est répondeuse au priming.

Notre protocole consistera en la comparaison de 5 groupes de 12 souris chacun : 1/ un groupe qui sera uniquement stimulé à l'AGS à 3 mois d'âge ; 2/ un groupe qui sera stimulé 4 jours consécutifs en commençant à 21 jours d'âge puis une nouvelle fois à 3 mois d'âge ; 3/ un groupe qui sera stimulé 4 jours consécutifs en commençant à 25 jours d'âge puis une nouvelle fois à 3 mois d'âge ; 4/ un groupe qui sera stimulé 4 jours consécutifs en commençant à 21 jours d'âge, puis 1 fois par semaine jusqu'à 2 mois d'âge, puis il sera une dernière fois stimulé à 3 mois d'âge ; 5/ un groupe qui sera stimulé 4 jours consécutifs en commençant à 25 jours d'âge, puis 1 fois par semaine jusqu'à 2 mois d'âge, puis il sera une dernière fois stimulé à 3 mois d'âge. Les animaux ayant subi un arrêt cardio-respiratoire durant le test seront réanimés à l'aide d'un respirateur (Procédure 2) pour leur permettre de suivre le protocole dans sa totalité. Au final, nous testerons 60 souris. Ces différents groupes permettront d'évaluer 1/ si la lignée de souris est sensible au priming ; 2/ s'il est important de commencer le priming à 21 jours ou si on peut commencer plus tard (à 25 jours par exemple) ; 3/ si le priming nécessite une stimulation régulière après son instauration à la période de stimulation de 4 jours entre 21-28 jours.

Concernant la règle Raffinement-Réduction-Remplacement, notre protocole suit des procédures standardisées soucieuses de minimiser le stress et toute souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites. Ceci se traduit par une visite quotidienne à l'animalerie pour contrôler le bien-être des animaux, l'enrichissement des cages autant que faire se peut, le respect des normes liées aux surfaces/volumes des cages pour éviter la surpopulation ainsi que celles liées aux plages acceptables pour la température et l'hygrométrie. En cas de poses d'électrodes cérébrales, les grilles employées sont plates pour éviter des chocs avec les électrodes ; la nourriture étant disposée à même la cage. La taille des échantillons est calculée pour permettre une mise en évidence d'un quelconque effet significatif connaissant la taille de l'effet attendu dans la population parente modulée par l'expérience que nous avons du trait mesuré. Enfin, il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in-vitro en remplacement de l'approche in-vivo puisque le trait évalué correspond à la réponse mettant en jeu tout un processus physiologique intégré chez un sujet respirant.

10958 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires destinés à être administrés au chat, des études de pharmacocinétique sont requises pour justifier du devenir du médicament dans l'organisme (administration-distribution-métabolisation et élimination, ADME).

L'objectif du projet (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez le chat dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs, pour

pouvoir établir le profil pharmacocinétique du produit en développement et évaluer sa biodisponibilité. Plusieurs études de pharmacocinétique pourront être requises pour répondre à l'ensemble de ces questions selon l'état d'avancement du développement du produit.

Ces informations réglementaires sont obligatoires et indispensables à la constitution du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du produit final. Ces études de pharmacocinétique doivent être conduites dans l'espèce cible.

L'espèce cible est le chat, jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études de pharmacocinétique. Le nombre d'animaux inclut dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit et la finalité de l'étude (évaluation de la biodisponibilité ou du profil pharmacocinétique du produit, bioéquivalence) et dans le respect des textes réglementaires, lignes directrices correspondantes en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 300 animaux.

Le projet (dénommé par la suite protocole cadre) vise à définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez le chat sans compromettre l'atteinte de l'objectif et dans le respect du bien-être animal et des principes de remplacement, de réduction et de raffinement,

- tous les traitements et prélèvements seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU et aucun d'entre eux n'est susceptible d'induire de dommage ni de souffrance chez l'animal,

- depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,

- les points limites sont toute altération du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit dans les jours suivant la pharmacocinétique ; toute observation laissant présager un début de mal-être est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour protéger l'animal

- les animaux sont hébergés à demeure pendant 4 à 5 ans et pourront participer plusieurs fois aux procédures décrites dans le présent projet. La décision de réutiliser un animal dans une procédure expérimentale sera prise par le vétérinaire si les conditions de l'article R2014-1 13 du Code rural et de la pêche maritime sont remplies.

Ce projet couvre également le recueil de sang, d'urine ou de fèces dans le but de préparer des matrices témoins requises pour la validation des méthodes de dosage des échantillons générés dans ce projet.

10959 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires, les produits induisant la superovulation permettent le développement de plusieurs follicules qui normalement seraient perdus par atresie au cours de chaque cycle. Elle permet ainsi, entre autres, le transfert d'embryons.

La preuve de concept d'efficacité de nouveaux traitements de superovulation doit être évaluée dans l'espèce cible.

L'objectif du projet (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études d'évaluation de l'activité pharmacologique d'un nouveau produit destiné à induire une superovulation chez la vache laitière ou la génisse, la brebis ou l'agnelle, la chèvre ou la chevrette, et la truie dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs, pour pouvoir suivre l'exposition de l'animal au médicament et objectiver la superovulation induite.

Le projet vise à caractériser les schémas thérapeutiques de nouveaux produits Plusieurs études d'activité pharmacologique pourront être requises pour établir le profil pharmacologique du produit et définir le schéma thérapeutique de superovulation efficace.

Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit et la finalité de l'étude (préliminaire, pilote, ...), le nombre de voies d'administration à tester, et dans le respect des textes réglementaires et lignes

directrices correspondantes en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 500 animaux pour chaque espèce considérée.

Les études réalisées dans le cadre de ce projet seront conduites séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés et en préservant leur bien-être,

- tous les traitements, suivis échographiques de la superovulation et prélèvements (sous anesthésie quand requis) seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU, et aucun d'entre eux n'est susceptible d'induire de dommage ni de souffrance chez l'animal,

- depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,

- les points limites sont, entre autres, toute altération inattendue du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, dont perte d'appétit, perte de poids, altération de la respiration, excrétion anormale, dans les jours suivant le(s) traitement(s) ; toute observation laissant présager un début de mal-être, est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour le protéger.

Ce projet couvre également

- le recueil de tissus ou organes dans le but de préparer des matrices biologiques témoins requises pour les activités de bioanalyse

- l'acquisition et le maintien des compétences techniques par le personnel assurant l'application des procédures expérimentales aux animaux, le développement de techniques et/ou méthodes, la validation d'équipements et/ou la génération de données historiques

10960 La prévalence de la stéatose hépatique non alcoolique dans la population générale est estimée à 24%. En raison de la propagation pandémique de l'obésité, la NASH est l'une des causes principales de maladie hépatique.

La NASH est un trouble métabolique se caractérisant par une accumulation progressive de lipides au niveau du foie puis d'un mécanisme inflammatoire associé ou non à une fibrose (cicatrisation des zones lésées du foie+ perte de fonctionnalité)

L'étiologie de la pathologie est multifactorielle, les thérapies à mettre en place pour la combattre sont donc nombreuses, et pour les développer nous avons besoin d'avoir recours à des modèles expérimentaux divers.

Pour étudier la maladie, certains modèles sont créés en l'induisant avec un agent chimique, d'autres en reproduisant chez l'animal un trouble métabolique par une alimentation hyper riche.

Les troubles du métabolisme des lipides et des glucides sont intimement liés, les maladies hépatiques métaboliques sont souvent présentes chez les patients insulino-résistants, diabétiques et/ou en surcharge pondérale. Dans notre projet, nous ferons appel à des animaux qui présentent des troubles métaboliques spontanés (animaux mutés). Nous utiliserons des souris qui sont déficientes pour le gène qui code pour le récepteur à la leptine, ce qui les rend diabétique et modérément obèses.

Nous les soumettrons à différents régimes alimentaires spéciaux (gras, sucrés et hypercaloriques) qui amplifieront les désordres métaboliques afin d'établir un modèle dans lequel la pathologie s'installera rapidement et qui sera utile pour évaluer les propriétés thérapeutiques des produits que nous développons

Ce projet s'inscrit dans un programme global qui consiste à terme à proposer sur le marché des médicaments pour prévenir, et soigner cette pathologie. Ce besoin médical est clairement exprimé actuellement.

La pathologie d'origine métabolique est multifactorielle, elle ne permet pas d'établir des méthodes alternatives pour l'étudier telle qu'elle se présente chez l'homme. Pour cette raison nous ne pouvons

éviter d'avoir recours aux animaux de laboratoire. La gravité des procédures qui seront réalisées dans ce projet sera légère modérée.

Pour restreindre les nombre d'animaux utilisés, nous ne procédons aux évaluations *in vivo* que des molécules ayant franchi avec succès les phases de sélection effectuées sur des modèles acellulaires ou cellulaires.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. Nous prévoyons l'emploi de 3446 souris au cours de la durée couverte par ce projet.

10961 Les thérapies médicamenteuses conventionnelles exploitent les propriétés toxiques d'agents anticancéreux. Ils agissent principalement sur les cellules tumorales mais parfois sur les cellules saines, provoquant des effets secondaires responsables de l'arrêt des traitements chez les patients. Depuis quelques années, des stratégies de chimiothérapies ciblant les cellules tumorales ont émergé afin de véhiculer un agent anticancéreux vers la tumeur sous la forme d'un médicament non toxique, puis de régénérer son activité toxique au niveau de la tumeur. De tels agents sont appelés vecteurs anticancéreux ou médicaments anticancéreux. Ainsi, nous créons des médicaments capables d'activer leur activité toxique uniquement après reconnaissance d'enzymes présentes dans le microenvironnement tumoral. A travers différents projets, notre laboratoire a démontré l'efficacité de cette stratégie contre les tumeurs primaires.

Dans ce projet, nous souhaitons étudier l'efficacité de ces traitements ciblés en combinaison avec un traitement déjà utilisé cliniquement chez l'homme qui a pour effet de recruter et de stimuler le système immunitaire au niveau de la tumeur. Nous comparerons donc l'efficacité thérapeutique antitumorale des agents anticancéreux vectorisés utilisés seuls ou en combinaison avec cet agent immunostimulant. Pour mener à bien cette étude, nous réaliserons une seule procédure expérimentale pour un total de 120 souris.

L'action combinée d'un agent anticancéreux vectorisé et d'un agent immunostimulant ne peut pas être abordée *in vitro*. Ces expériences nécessitent obligatoirement l'usage de modèles animaux. Comme mentionné plus haut, la stratégie de ciblage des tumeurs a déjà été validée par notre laboratoire lors d'études préliminaires. Les données recueillies lors de nos précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales. Par une approche statistique, la « Règle des 3R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation tout en assurant un nombre suffisant permettant une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences (réduire). Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées (groupe de 5 souris, nid, jouets, etc) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffiner). Afin de réduire le stress des animaux généré par les expérimentations, ces dernières seront réalisées sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Par ailleurs, en cas d'apparition de douleurs chez les animaux une administration d'analgésique (buprénorphine) sera réalisée. Afin de pouvoir étudier notre stratégie thérapeutique chez des animaux, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives *in vitro* (remplacer).

10962 Les maladies auto-immunes résultent d'un dysfonctionnement du système immunitaire le conduisant à s'attaquer aux propres constituants de l'organisme. Les causes sont d'origine à la fois génétique, environnemental (agents infectieux, agents toxiques, médicaments) et hormonal. Plus de 80 maladies auto-immunes sont décrites à ce jour dont l'étiologie reste essentiellement inconnue. Dans leur ensemble, elles représentent la 3ème cause de morbidité dans les pays développés et affectent 5 à 7% de la population. Une meilleure compréhension de leur physiopathologie est nécessaire pour améliorer le traitement des patients. Le lupus érythémateux disséminé/systémique (LED) est une maladie auto-immune chronique responsable de destructions tissulaires multiples (peau, reins, poumons). Bien que de nombreuses anomalies de l'immunité aient été caractérisées, la physiopathologie du LED reste mal connue car complexe. Les souris de cette

étude représentent un modèle exceptionnel de la maladie humaine puisqu'elles développent spontanément des atteintes cutanées, pulmonaires, rénales et articulaires dues à des infiltrats lymphoïdes et des titres élevés en auto-anticorps. Ces derniers sont responsables de glomérulonéphrites qui sont la complication la plus grave du LED. Ces souris présentent aussi des taux sériques anormalement élevés de cytokines ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude de l'implication des cytokines dans le développement du LED. Comme dans l'espèce humaine, ces souris présentent un fort dimorphisme sexuel, les femelles étant plus touchées que les mâles. La sévérité des atteintes tissulaires du LED est actuellement contrôlée par des corticoïdes et des immunosuppresseurs. Cependant, leur utilisation au long cours altère les réponses immunitaires engendrant un risque infectieux important pour le patient. Les effets secondaires de ces médicaments incitent à rechercher de nouveaux traitements. Cette lignée de souris est un modèle unique pour évaluer l'efficacité de nouveaux traitements ainsi que leur mécanisme d'actions car il est actuellement impossible de reproduire *in vitro*, ou même *ex vivo*, la complexité des interactions cellulaires à l'œuvre lors des réponses immunitaires normales ou pathologiques. Ce projet a pour but de déterminer, à travers une expérience pilote, la cinétique de mise en place des processus pathologiques à l'œuvre dans la maladie lupique. Cette expérience pilote a pour but d'optimiser afin de réduire la quantité d'animaux à utiliser au cours des expériences ultérieures. Afin de respecter la règle des trois R, le nombre total d'animaux sera de 40 compte-tenu de la variabilité des réponses immunitaires individuelles et comprendra des souris mâles ou femelles âgées de 6 à 28 semaines soit avant et après l'apparition du LED. Ce nombre d'animaux garantira la valeur statistique des résultats obtenus. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, l'évolution du LED sera suivie par imagerie *in vivo* qui est une méthode non destructive, non invasive et non traumatique. Afin de raffiner l'expérience, les souris seront anesthésiées lors des prélèvements sanguins. Le suivi clinique des souris sera réalisé quotidiennement et il sera renforcé avec le développement de la maladie. Elles seront mises à mort en cas de perte de poids supérieure à 15%. Comme il existe un fort dimorphisme sexuel dans le développement de la maladie, nous utiliserons à part égale des mâles et des femelles. Cette expérience pilote permettra une optimisation des expériences qui seront conduites ultérieurement dans ce modèle murin et donc une réduction du nombre d'animaux nécessaires à leur réalisation.

10963 Les maladies auto-immunes résultent d'un dysfonctionnement du système immunitaire le conduisant à s'attaquer aux propres constituants de l'organisme. Les causes sont d'origine à la fois génétique, environnemental (agents infectieux, agents toxiques, médicaments) et hormonal. Plus de 80 maladies auto-immunes sont décrites à ce jour dont l'étiologie reste essentiellement inconnue. Dans leur ensemble, elles représentent la 3ème cause de morbidité dans les pays développés et affectent 5 à 7% de la population. Une meilleure compréhension de leur physiopathologie est nécessaire pour améliorer le traitement des patients. Le lupus érythémateux disséminé/systémique (LED) est une maladie auto-immune chronique responsable de destructions tissulaires multiples (peau, reins, poumons). Bien que de nombreuses anomalies de l'immunité aient été caractérisées, la physiopathologie du LED reste mal connue car complexe. Les souris de cette étude représentent un modèle exceptionnel de la maladie humaine puisqu'elles développent spontanément des atteintes cutanées, pulmonaires, rénales et articulaires dues à des infiltrats lymphoïdes et des titres élevés en auto-anticorps. Ces derniers sont responsables de glomérulonéphrites qui sont la complication la plus grave du LED. Ces souris présentent aussi des taux sériques anormalement élevés de cytokines ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude de l'implication des cytokines dans le développement du LED. Comme dans l'espèce humaine, ces souris présentent un fort dimorphisme sexuel, les femelles étant plus touchées que les mâles. Cette lignée de souris est un modèle unique pour évaluer l'efficacité de nouveaux traitements ainsi que leur mécanisme d'actions car il est actuellement impossible de reproduire *in vitro*, ou même *ex vivo*, la complexité des interactions cellulaires à l'œuvre lors des réponses immunitaires normales ou pathologiques. L'élevage de ces souris permettra 1) d'analyser les mécanismes responsables des processus inflammatoires physiologiques et pathologiques ; 2) de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques (études précliniques). En se basant sur nos études précédentes, qui ont permis d'optimiser la quantité d'animaux à utiliser, 1200 souris seront nécessaires pour réaliser ce

projet (durée 5 ans) et produire des résultats fiables. L'utilisation à des fins expérimentales des souris ayant servi à la reproduction permettra de réduire le nombre d'animaux à élever. La quantité de coton dans les litières est doublée afin de faciliter la réalisation de nids. Le suivi clinique des souris est quotidien et sera renforcé vers l'âge de 12 semaines avec le développement des pathologies. Elles seront mises à mort en cas de perte de poids supérieure à 15%. Comme il existe un fort dimorphisme sexuel dans le développement de la maladie, nous élèverons à part égale des mâles et des femelles. L'élevage de cette lignée de souris permettra une meilleure compréhension de l'étiologie des maladies auto-immunes de type lupique et donc une amélioration de l'efficacité des traitements.

10964 Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) de l'enfant et de l'adolescent sont des cancers pédiatriques rares, dont le pronostic s'est peu amélioré au cours des 25 dernières années. Les taux de rechute et de survie sont respectivement d'environ 45% et 65%. Le traitement standard comprend une polychimiothérapie, parfois associée à une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) pour les patients de haut risque ou en rechute. La greffe de CSH est un traitement lourd, source de séquelles à long terme. Des progrès sont donc nécessaires pour réduire le taux de rechute, améliorer la survie et limiter les séquelles. L'objectif de nos études est de caractériser les mécanismes mis en jeu dans les leucémies (cancer des cellules sanguines) de l'enfant à mauvais pronostic. Pour cela nous identifions les gènes altérés par des mutations (oncogènes ou gènes suppresseur de tumeurs) dans les échantillons de patients atteints de leucémie puis nous exprimons ces mutations dans des cellules normales pour comprendre le rôle de ces mutations dans la transformation cancéreuse et tester de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Pour ce projet, nous réalisons des approches de cultures cellulaires *in vitro* et des approches de modélisation bio-informatique pour comprendre les conséquences de ces mutations. La nécessité d'utiliser des modèles animaux dans ce projet est cependant incontournable pour les raisons suivantes :

-La génération et la maturation terminale de toutes les lignées hématopoïétiques à partir de cellules souches n'est actuellement pas possible par des techniques de culture *in vitro*.

-Des lignées cellulaires immortalisées et poussant *in vitro* ne sont pas disponibles pour la plupart des oncogènes que nous étudions. D'autre part, plusieurs études montrent que ces lignées cellulaires cultivées *in vitro* divergent significativement des échantillons leucémiques de patients.

-Les approches de culture *in vitro* ne permettent pas reproduire certaines caractéristiques des leucémies (ex : infiltration des cellules leucémiques dans le système nerveux). Comme certaines leucémies sont spécifiques de l'enfant, il est important de comprendre la spécificité des différents stades de développement sur l'apparition et le type des tumeurs *in vivo*.

-Des modèles précliniques *in vivo* sont indispensables pour développer des composés pharmacologiques efficaces pour cette pathologie de très mauvais pronostic.

La physiologie du système hématopoïétique a déjà été caractérisée de façon importante chez la souris par d'autres équipes et a permis de montrer sa proximité avec le système humain. Nous utilisons donc des modèles murins. Aucun modèle du sous-type de leucémie que nous étudions n'existe à ce jour et nous souhaitons comprendre la transformation par 3 oncogènes de fusion retrouvés de façon récurrente dans ces leucémies humaines. Dans l'ensemble, ces approches nécessitent donc de maintenir plusieurs lignées en parallèle, afin de pouvoir les comparer et les étudier dans différentes conditions. Les contraintes pour les animaux seront celles du développement de maladies équivalentes à celle de l'enfant (leucémies). Les expérimentations seront faites sous anesthésie et avec analgésie. Une surveillance précise et continue des animaux sera effectuée afin de détecter tout éventuel signe de maladie leucémique et des mesures pour les soulager seront prises comme des soins spécifiques et des adaptations alimentaires.

En utilisant des outils statistiques permettant de définir le nombre minimal d'animaux à utiliser pour obtenir des conclusions significatives pour chaque approche, nous prévoyons d'utiliser 1770 souris dans ce projet. L'existence d'autres modèles d'autres leucémies nous permet de définir précisément

les points limites pour chaque approche afin de réduire à un minimum les contraintes et souffrances éventuelles. D'autre part, nous travaillons activement sur une approche indépendante de culture de cellules humaines pluripotentes qui ont actuellement une capacité à donner des cellules hématopoïétiques. Cependant, à ce jour, les cellules hématopoïétiques obtenues par cette approche sont générées en nombre limité et présentent une faible fonctionnalité ne permettant pas une substitution complète avec approches *in vivo*. Cependant, en fonction des résultats qui seront obtenus au cours des 5 prochaines années, cette approche pourrait permettre de réduire significativement le nombre d'animaux utilisés dans ce projet.

10965 Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquent chez l'Homme. Sa prévalence est en constante progression depuis 1975 et représentait environ 1,2 million de cas en 2008. Avec environ 609 000 décès imputés par an, c'est également la quatrième cause de décès par cancer. Les formes familiales de CCR ont fait l'objet de nombreuses études et les gènes associés sont bien connus. Cependant, les cancers colorectaux sporadiques représentent ~80-90% des cas. Aussi, on considère qu'au moins 80% des causes de CCR sont liées à des facteurs environnementaux, alors les facteurs génétiques familiaux représentent seulement 10 à 20% de la causalité.

Le microbiote intestinal, qui regroupe l'ensemble des microorganismes présents dans le tractus digestif, est un élément essentiel de l'environnement colique et les interactions entre microbiote et CCR font l'objet d'un intérêt croissant. Il a été notamment constaté chez les patients atteints d'un CCR un déséquilibre dans la composition du microbiote appelé dysbiose avec une surreprésentation des bactéries *Escherichia coli* au niveau des tumeurs. La caractérisation de ces souches d'*E. coli* a révélé qu'elles sont capables d'adhérer fortement et d'envahir les cellules épithéliales intestinales. Le contrôle de leur multiplication intracellulaire à dans la cellule hôte se fait par un mécanisme appelé autophagie.

L'autophagie est un processus biologique nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire et au renouvellement des organites cellulaires. L'autophagie consiste à la formation à l'intérieur du cytoplasme d'une vésicule membranaire permettant de séquestrer les organelles non fonctionnelles, les protéines mal repliées ou des pathogènes afin de les dégrader. Le processus autophagique est perturbé dans de nombreux cancers dont le CCR.

Notre hypothèse est qu'un défaut d'autophagique pourrait non seulement favoriser *in vivo* la colonisation des *E. coli* associés au cancer colorectal, mais participer aussi au phénomène de dysbiose observé chez les malades et impacter ainsi directement sur le développement du CCR. Pour cela, des souris prédisposées à développer un CCR, déficientes ou non pour l'autophagie, seront infectées avec une souche d'*E. coli* colonisant les tumeurs coliques humaine. Ensuite, nous analyserons chez les animaux la composition de leur microbiote intestinal, le taux de colonisation des *E. coli*, l'inflammation intestinale ainsi que le développement tumoral.

Sur la durée du projet qui est de 5 ans, nous utiliserons 180 souris. Aucune méthode alternative n'existe car nous désirons étudier le microbiote intestinal, la colonisation bactérienne, l'inflammation ainsi que le développement cancéreux. Les animaux seront hébergés dans des cages standards avec un accès illimité à l'eau et à la nourriture. De plus le milieu sera enrichi à l'aide de maisons en carton.

Dans le cadre de la règle des 3R, un maximum de prélèvements sera réalisé afin de limiter le nombre d'animaux utilisé. Les données que nous possédons sur l'infection de souris avec des souches d'*E. coli* isolées de CCR indiquent qu'elles n'induisent pas de diarrhée et que l'inflammation reste très modérée. Cependant, une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur. Si besoin, les animaux seront traités avec un anti-inflammatoire non stéroïdien, le paracétamol, qui sera administré par gavage. Le poids des souris sera également suivi avec attention (2 fois par semaine) car il reflète bien l'inflammation intestinale, la sévérité d'une diarrhée ainsi que le développement du CCR. Une perte de plus de 15% du poids initial constituera un critère d'arrêt. L'animal en question sera mis à mort.

10966 Chaque année 1,5 millions d'européens sont victimes d'un traumatisme crânien le plus souvent subit lors d'un accident de la route, d'une chute ou au cours de pratiques sportives. 70 000 personnes perdent la vie des suites du traumatisme et environ 100 000 ne présentent pas de récupération totale et demeurent handicapés, notamment chez les enfants et les jeunes adultes qui représentent une population particulièrement vulnérable en regard de ce type de traumatisme. Bien qu'au cours des dernières années un raffinement des procédures de prise en charge par les urgences et les hôpitaux a permis de réduire la mortalité des traumatisés crâniens, il est apparu qu'un grand nombre de patients souffrent par la suite de désordres chroniques invalidants tels que : épilepsie, dépression, démence progressive, etc. À ce jour, aucun traitement ne permet d'empêcher la mise en place de tels désordres à la suite d'un traumatisme crânien.

Dans le but d'identifier des cibles pour de potentiels traitements, le projet que nous souhaitons développer sur 4 années vise à évaluer l'implication d'une molécule de la matrice extracellulaire : le Perlecan sur la récupération après un traumatisme crânien, afin ensuite d'évaluer l'intérêt thérapeutique de ce composé.

Pour atteindre cet objectif, nous nous appuyons sur l'utilisation d'un modèle murin de traumatisme crânien (TC) peu invasif mimant la clinique humaine, nous permettant d'étudier, à l'aide de tests comportementaux et d'outils d'imagerie, les processus de neuroinflammation et de dégénérescence au niveau du système nerveux central avec une définition encore inaccessible chez l'homme. De plus, le modèle murin nous permet d'utiliser une souche de souris transgénique n'exprimant pas la molécule cible.

Nous allons dans un premier temps étudier l'impact de la déplétion en Perlecan sur la récupération post-traumatique en comparant les souris n'exprimant plus cette molécule (pIn-/-) aux souris sauvages (WT). Dans un deuxième temps nous étudierons l'intérêt de la supplémentation en perlecan en injectant la partie active de cette molécule : le domaineV (DV) à la fois chez les souris pIn-/- et les souris WT afin de déterminer l'intérêt thérapeutique de la modification de l'expression de ce domaine afin d'envisager le développement de nouveaux traitements.

Le projet respecte et applique les exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement en matière d'expérimentation animale. Les procédures expérimentales décrites dans le projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Le projet concerne 528 souris. Le suivi longitudinal non invasif réalisé en imagerie permet de réduire significativement le nombre de groupes d'animaux utilisés, sans compromettre les objectifs du projet et nous permet un transfert facilité vers la clinique humaine. Finalement, le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en œuvre uniquement par du personnel technique / de recherche formé et qualifié et respecte la règle des 3R. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet et pour le garantir, les animaux sont hébergés selon les standards prévus par la réglementation : en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi (matériel de nidification, rouleau en carton et barre à ronger). Des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux. De plus, nous réalisons la procédure de traumatisme crânien sous anesthésie générale et avons mis en place une surveillance accrue des animaux après induction du traumatisme afin de réagir et interrompre l'expérimentation si l'animal montre des signes de souffrance.

10967 Dans le but de faciliter l'administration par voie orale chez le chien d'un médicament ou d'un nutraceutique en cours de développement, la prise volontaire, et donc l'appétence du produit, est primordiale. Un produit qui doit être mélangé à la nourriture n'est pas considéré appétent.

L'appétence des produits peut être améliorée par l'ajout de composés odorants, bien que ce ne soit pas toujours nécessaire, ce qui se traduit par une meilleure prise spontanée par les animaux et facilite ainsi la bonne observance du traitement par le propriétaire. Pour pouvoir revendiquer l'acceptance/appétence (ou palatabilité) du produit, des études appropriées sont requises puisque la référence à la seule composition n'est pas suffisante pour garantir l'appétence. En effet, la forme,

la texture, la taille, la dureté ou encore l'odeur du produit peut influencer sur la bonne acceptabilité du produit par l'animal et donc sa consommation spontanée.

La prise spontanée peut être évaluée sur une prise unique ou sur des prises répétées, l'étude sera alors dénommée acceptation ou appétence respectivement.

L'objectif du projet (dénommé par la suite protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études d'acceptation/appétence chez le chien dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs, pour pouvoir évaluer la consommation spontanée par l'animal du produit en développement. Plusieurs études d'acceptation/appétence pourront être requises pour répondre à l'ensemble de ces questions selon l'état d'avancement du développement du produit, selon le schéma posologique envisagé, avec une présentation unique ou des présentations répétées du produit au même animal.

Ces informations réglementaires sont obligatoires et indispensables pour revendiquer l'acceptation/appétence du produit. Ces études d'acceptation/appétence doivent être conduites dans l'espèce cible.

L'espèce cible est le chien, jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études d'appétence. Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon le schéma posologique (administration unique ou sur le long terme) du produit testé, et selon les exigences des textes réglementaires et les recommandations des lignes directrices correspondantes en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 300 animaux sur la durée du projet.

L'acceptation/appétence étant évaluée par la prise spontanée du produit à tester par l'animal, aucun traitement n'est imposé à ce dernier,

- toutes les présentations de produits seront réalisées conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU et aucun produit n'est susceptible d'induire de dommage ni de souffrance chez l'animal,
- depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,
- les points limites sont tout changement du comportement ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit ou de poids dans les jours suivant la consommation du produit ; toute observation laissant présager un début de mal-être est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour protéger l'animal,
- les animaux sont hébergés à demeure pendant 4 à 5 ans et pourront participer plusieurs fois aux procédures décrites dans le présent projet. La décision de réutiliser un animal dans une procédure expérimentale sera prise par le vétérinaire si les conditions de l'article R2014-1 13 du Code rural et de la pêche maritime sont remplies.

10968 Nous avons pour projet d'enregistrer l'activité des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (ATV), région cérébrale impliquée dans la motivation, *ex vivo* sur des tranches de cerveau de souris. Cet enregistrement est difficile à mettre au point car cette région cérébrale est très hétérogène, sans organisation bien délimitée des différents types neuronaux (dopaminergiques, GABAergiques, glutamatergiques). Une experte de cette technique d'enregistrement éprouve de grandes difficultés à enregistrer ce type neuronal particulier (dopaminergique) malgré plusieurs mois de travail, du fait de cette hétérogénéité et de la difficulté de reconnaître ces neurones.

Le but de la présente demande de création de lignée est de permettre la reconnaissance aisée des neurones dopaminergiques par l'expression d'une fluorescence spécifiquement dans ce type cellulaire. En effet, les souris de la présente lignée seront obtenues par le croisement (i) de souris présentant un reporter fluorescent (Ai6/Ai6) uniquement exprimé en présence d'une enzyme (Cre recombinase), et (ii) de souris exprimant cette enzyme uniquement dans les neurones dopaminergiques (Dat-Cre). L'utilisation de Cre recombinase pour le ciblage de neurones, est à l'heure actuelle très largement répandue au sein des laboratoires de recherche. La lignée ainsi générée permettra la reconnaissance et le ciblage du type neuronal d'intérêt directement par

microscopie à fluorescence. Cette approche nous permettra donc d'avoir une spécificité neuronale accrue, outil indispensable pour l'avancement de nos recherches, tout en réduisant le nombre de sujets nécessaires à la mise en place de cette technique. L'étude bibliographique se rapportant au sujet nous a indiqué qu'il n'existe pas de remplacement disponible à notre modèle expérimental afin d'atteindre les objectifs scientifiques du travail proposé.

Ce projet respecte la règle des 3R :

1. Pour le Remplacement, nous n'avons d'autre choix que d'enregistrer *ex vivo* des neurones issus de souris car il n'existe pas de modèle de remplacement.
2. Pour la Réduction, nous limiterons au maximum le nombre d'animaux y compris pour les croisements reproducteurs. Dans ce dernier cas, 5 trios de souris (1 mâle et 2 femelles par cage) seront utilisés pour produire puis 2 trios seront hébergés en continu pour maintenir la lignée ce qui représente 131 animaux au total. Pour les études expérimentales, nous limitons l'utilisation des souris à un nombre minimal qui prend en compte la valeur statistique des données enregistrées et le pourcentage de succès de la technique.
3. Pour le Raffinement, puisque cette lignée n'implique ni addition ni délétion de nouveaux gènes mais le remplacement d'un gène par le même gène associé à un marqueur fluorescent, nous considérons que cela n'entraînera pas d'effet négatif en relation avec le bien-être de l'animal. En tout cas, un suivi systématique des critères d'interruption (points d'arrêt anticipés) sera mis en place. Pour supprimer l'angoisse ou la détresse des animaux au cours de la procédure, les animaux seront élevés en cages collectives enrichies.

10969 Les HDLs (ou les lipoprotéines de haute densité, appelées communément "bon cholestérol") ont des effets bénéfiques sur la paroi vasculaire. Ils ont des effets vasodilatateurs ainsi que des effets protecteurs contre la formation de la thrombose et la plaque d'athérome. Ils stimulent aussi la régénération des vaisseaux et améliorent l'efficacité des techniques de reperfusion vasculaire. La recherche fondamentale et clinique s'intéresse aux mécanismes responsables de cette protection. De récentes pistes d'étude ont soulevé de potentiels mécanismes sur des modèles cellulaires. Afin de valider les observations, il devient nécessaire d'utiliser des modèles animaux pour mesurer l'importance de ces mécanismes à l'échelle d'un vaisseau. Ce projet implique donc l'utilisation de modèles murins qui permettront d'explorer l'impact physiologique de ces nouvelles voies dans la vasodilatation et la perfusion vasculaire ainsi que dans la formation de la thrombose artérielle. Le nombre estimé de souris à utiliser pour le présent projet est de 6983 souris. Des mesures seront intégrées pour respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer). Par exemple, des efforts seront portés pour réduire le nombre d'animaux dans chaque expérimentation, et, de plus, un même animal pourra être utilisé pour la mesure de plusieurs paramètres, optimisant ainsi la quantité de résultats obtenus par rapport au nombre d'animaux utilisés. Des mesures de raffinement sont aussi prises pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux autour des procédures expérimentales. Ainsi, les animaux seront hébergés dans des locaux parfaitement adaptés. Ils auront libre accès à l'eau et à la nourriture, et leur état de santé sera suivi régulièrement par du personnel qualifié qui veillera aussi à leur bien-être (enrichissement dans les cages). Des mesures seront mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales (anesthésie, tapis chauffant et injection d'un antidouleur en péri- et post-opératoire). Il est aussi prévu un suivi du poids, de l'hydratation, de l'attitude de l'animal et des plaies opératoires. Une procédure du présent projet est classée sévère : le projet fera donc l'objet d'une évaluation rétrospective. Les résultats obtenus constitueront un appui de recherche fondamentale et préclinique permettant d'évaluer l'importance des différents acteurs étudiés dans la physiologie vasculaire et de proposer des stratégies thérapeutiques pour les maladies cardiovasculaires.

10970 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) incluant la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique touchent chaque année quelques milliers de personnes en France. Ces maladies inflammatoires du tube digestif évoluent par alternance de phases dites de « poussées » et de phases de rémissions. Les symptômes comprennent diarrhée, fièvre, douleurs abdominales, fatigue et perte d'appétit. Le manque de connaissance sur l'étiologie de ces deux maladies et la

grande hétérogénéité des symptômes rendent le traitement difficile. L'objectif thérapeutique qui était autrefois une réduction des symptômes, a récemment évolué vers un objectif de « rémission physiologique » regroupant à la fois la réduction des symptômes et la régénération de l'intestin. Les nouvelles thérapeutiques dites « biologiques », ont constitué une grande avancée, mais elles restent très coûteuses et ne sont pas toujours efficaces. La mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques apparaît dès lors nécessaire. Le but de notre travail est de tester des molécules à viser thérapeutique.

Les effets pléiotropiques des molécules et les enjeux thérapeutiques sous-jacents rendent indispensable l'utilisation de modèles *in vivo*. Nos modèles d'inflammation et de douleur intestinales sont indispensables pour étudier les effets d'une molécule sur un organisme entier et pour accélérer le passage en clinique chez l'homme. Les modèles animaux sont devenus essentiels pour déterminer les mécanismes physiopathologiques et les processus immunologiques à l'origine de l'inflammation chronique des muqueuses et de la douleur. A ce jour il existe de nombreux modèles décrits dans la littérature, tous induisent chez l'animal (avec un degré de sévérité plus ou moins important), une perte de poids, un ramollissement des fèces et diarrhée ainsi qu'une présence de sang dans les fèces. Cependant, aucuns de ces modèles ne présentent tous les critères de la pathologie humaine. Le modèle animal à considérer doit être choisi selon les aspects de la maladie humaine qu'il doit reproduire. L'objectif de cette étude est d'évaluer le rôle de médiateurs endogènes comme molécules thérapeutiques pour les MICI chez la souris.

Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 2016 souris en raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs). Le détail du nombre d'animaux sera présenté pour chaque procédure. Dès l'induction de la pathologie, les animaux seront suivis régulièrement au cours du temps (de 7 jours et jusqu'à 6 semaines selon le modèle) par des techniques non invasives : suivi du poids, consistance des fèces et présence de sang dans les fèces, évaluée par le test Hémocult II®. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet d'observer au cours du temps un seul animal, là où l'information devait être obtenue par euthanasie et autopsie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude, permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux. De plus, afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement sera rajouté aux animaux. A savoir, dans un premier temps, des carrés de coton pur ou du papier absorbant permettant aux animaux de faire une nidation. Selon la durée de l'étude, un deuxième enrichissement pourra être introduit dans l'environnement, tel que des aspen Brick, des tunnels en polycarbonate ou des igloos. Une étude rétrospective sera effectuée à la fin de chaque expérience pour déterminer les possibilités de diminution du nombre d'animaux et/ou d'amélioration des procédures pour diminuer la souffrance animale. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé quotidiennement. Une veille bibliographique sera effectuée pour déterminer si des méthodes de remplacement ont été mise en place. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

10971 Le paracétamol, également appelé acétaminophène ou N-acétyl-p-aminophénol (APAP), est un antipyrétique et un analgésique. Bien que le métabolisme et la toxicité de l'APAP aient fait l'objet d'études approfondies et que sa variabilité en termes de toxicité soit connue, le rôle présumé du métabolite microbien, le p-crésol, dans la toxicité de l'APAP n'a été mis en évidence que récemment. En effet, il a été suggéré que l'APAP pourrait entrer en compétition, pour être sulfaté par l'enzyme SULT1A1 hépatique, avec le co-métabolite bactérien p-crésol, sécrété par *Clostridium difficile* et d'autres espèces de bactéries, à la suite de la dégradation de la tyrosine. Une fois formés, les conjugués sulfates des deux composés sont soumis à une excrétion rapide dans l'urine. Un modèle représentant la variation de la concentration de p-crésol après l'ingestion de tyrosine dans l'alimentation, comme chez l'homme, s'est avéré être un modèle *in vivo* adapté pour co-administrer l'APAP et mieux définir le rôle du microbiote intestinal dans le métabolisme de l'APAP et plus particulièrement le rôle du p-crésol dans le métabolisme et la toxicité de l'APAP. Le but de l'étude est de mieux comprendre la compétition entre le p-crésol et l'APAP en ce qui concerne leur sulfatation et son lien avec le métabolisme de l'APAP et sa toxicité potentielle. Ne pouvant étudier

les conséquences d'un régime riche en tyrosine dans un système *in vitro*, les modèles animaux rongeurs sont un outil de référence pour l'étude des mécanismes impliqués dans le métabolisme des substances ingérées (aliment, médicament) en lien avec le métabolisme microbien intestinal. Dans cette étude, 2 lots de souris seront utilisés à des dates différentes. Un lot comprend 32 souris soumises à un régime riche en tyrosine avec (N = 16) ou sans antibiothérapie (N = 16) afin d'être utilisées dans le projet et 8 souris nourries avec un régime standard pour être utilisées comme contrôles. L'ensemble des animaux qui seront utilisés pour la mise en œuvre de ce projet a été évalué à 80 sur 5 ans. Le recours aux modèles animaux est indispensable pour étudier les mécanismes physiologiques d'une interaction complexe entre l'hôte et le microbiome. La règle des 3R est appliquée ici pour les principes de réduction et de raffinement. Nous réalisons le protocole à la demande du client. Le nombre d'animaux est calculé selon son protocole expérimental, soit 80 souris sur 5 ans. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement. Les points limites sont observés tout au long du projet. Une surveillance des animaux est réalisée quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur. Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la structure bien-être animal.

10972 Suite à la Loi sur l'Eau et les Milieux Aquatiques de 2006, de nouveaux classements des cours d'eau, prenant en compte la restauration de la continuité écologique, sont parus en 2012-2013. Sur les cours d'eau classés en liste 2, les aménagements qui font obstacle à la continuité écologique doivent être équipés ou gérés de manière à rétablir le franchissement des poissons (par exemple par effacement de l'ouvrage ou construction d'une passe à poissons).

Parmi les différents types de passes à poissons, les rampes à macrorugosités constituent une solution technique intéressante en termes de franchissabilité par toutes les espèces de poissons, et elles sont mises en œuvre régulièrement en France. Des études hydrauliques en laboratoire ont permis d'établir les critères de conception de ces rampes mais les retours d'expérience *in situ* sur l'efficacité de ces dispositifs sont toutefois peu nombreux. Il apparaît aujourd'hui nécessaire de mener plus d'études pour quantifier l'efficacité de ces dispositifs, avec un focus sur les espèces encore peu étudiées jusqu'à présent et dont les capacités de nage sont plus réduites (goujon, spirilin, gardon, etc.).

Deux sites ont été identifiés pour la réalisation de tests d'efficacité. Le suivi des déplacements des poissons se fera par marquage des individus à l'aide de PIT tags (Passive Integrative Transponder tags) et détection de ces PIT tags par des antennes RFID installées dans le dispositif de franchissement étudié. Trois tailles de marques (12, 23 et 32 mm) seront utilisées en fonction de la taille et du poids des poissons. Ces marques, jugées très peu invasives pour les poissons, ne compromettent ni leur survie ni leur reproduction. Les poissons conservent les marques à vie.

Les espèces suivantes seront ciblées principalement : barbeau, chevaine, goujon, ablette, vandoise, spirilin, gardon. Les périodes et les facteurs déclenchant la migration de ces espèces n'étant pas connus précisément, les suivis seront conduits durant l'année entière, et ce durant a minima 3 ou 4 années. En revanche, les marquages seront réalisés uniquement trois années de suite. Les poissons seront échantillonnés par pêche à l'électricité en aval et en amont de la rampe étudiée, et stabulés dans des viviers immergés dans la rivière. Après la biométrie et le marquage sous anesthésie, tous les poissons seront relâchés en aval de la rampe, sur leur secteur de prélèvement pour ceux prélevés en aval et dans le secteur aval le plus proche de la rampe pour ceux prélevés en amont. Au total, il est prévu de marquer au maximum 1500 individus toutes espèces confondues sur chaque site d'étude pour les trois années de marquage, soit 500 par an au maximum.

Plusieurs mesures seront appliquées pour respecter la règle des 3R. Pour réduire le nombre d'animaux, seuls les adultes seront marqués et le nombre de poissons marqués pourra être réduit s'il s'avère surestimer. La douleur et le stress seront réduits grâce à l'implantation des transpondeurs sous anesthésie générale et la surveillance régulière des conditions de stabulation.

Le temps de captivité sera réduit au maximum pour assurer un retour le plus rapide possible en milieu naturel après anesthésie.

10973 L'objectif de notre projet de recherche est de développer de nouvelles thérapies pour traiter la leucémie aiguë lymphoblastique, qui touche particulièrement les enfants. En effet, même si la qualité des traitements de cette maladie a été grandement améliorée au cours de ces 50 dernières années, les patients sont traités avec une poly-chimiothérapie intensive qui est responsable de nombreux effets secondaires. Heureusement, pour un grand nombre d'entre eux, cette phase du traitement permet d'obtenir une rémission, durant laquelle les symptômes de la maladie disparaissent. Mais malheureusement, lorsque le patient rechute, les cellules leucémiques sont plus résistantes et les traitements dont disposent les médecins actuellement sont beaucoup moins efficaces. Il est donc important d'identifier de nouvelles molécules capables d'éliminer les cellules leucémiques pour guérir définitivement les patients.

Dans le cadre de notre projet, nous disposons de 4 composés chimiques que nous avons d'abord testés *in vitro* sur des modèles cellulaires de leucémie. Nous avons pu montrer qu'ils ralentissent la prolifération des cellules leucémiques maintenues en culture. Pour aller plus loin, nous devons confirmer l'efficacité des composés sur le ralentissement de la leucémie *in vivo* et vérifier qu'ils n'aient pas d'effets néfastes. Pour cela, nous devons mener une étude préclinique sur des modèles de souris. Nous disposons d'échantillons de cellules leucémiques provenant de patients que l'on peut transplanter à nos souris immunodéficientes. Quelques semaines après l'injection, les cellules leucémiques humaines sont présentes dans la moelle osseuse et la rate des souris qui constituent un modèle d'étude qui correspond à ce que l'on observe chez les patients. Afin de respecter la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement), nous étudierons les voies signalétiques impactées en traitant les cellules *in vitro* (remplacement). Pour chacune de nos expérimentations *in vivo*, nous utiliserons des groupes de 7 souris maximum, ce qui correspond à la taille d'échantillon minimum nécessaires à nos tests statistiques. De plus, nous étudierons plusieurs éléments sur un même groupe de souris dès que cela est possible (réduction). Enfin, dans le but de préserver le bien-être animal (raffinement) et pour anticiper l'arrivée des signes de souffrance liés à la maladie, nous suivrons l'évolution de la leucémie en prélevant une très faible quantité de sang au niveau de la veine de la queue. Par ailleurs, nous développons un nouveau modèle qui nous permettra de suivre l'évolution de la leucémie de manière non invasive, grâce à des techniques d'imagerie *in vivo* dès que nous disposerons de l'appareil. Nous avons prévu d'effectuer nos expérimentations sur des souris mâles et femelles, car la transplantation peut se faire sur les deux sexes. Nos expérimentation se feront sur 4 années et 319 souris au total seront incluses dans nos protocoles expérimentaux.

10974 L'obésité et la consommation chronique d'alcool constituent les premières causes des maladies chroniques du foie en France et sont reconnues comme d'importants problèmes de santé publique. De plus, la proportion de patients obèses avec une consommation chronique d'alcool augmente dangereusement et ces comorbidités favorisent la progression et la sévérité des complications hépatiques. Il est donc urgent de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'évolution de ces atteintes hépatiques qui peuvent atteindre le stade de cirrhose ou de cancer. Les cellules innées lymphoïdes (ILCs), les lymphocytes T et les macrophages font partie des cellules du système immunitaire impliquées dans les processus inflammatoires suite à un stress microbien ou métabolique. Ces cellules sont retrouvées entre autre au sein du tissu adipeux et de l'intestin, acteurs extra-hépatiques qui participent au développement et à l'évolution des complications hépatiques. Notre équipe de recherche s'intéresse à la protéine CD44 (molécule de surface impliquée dans les interactions cellulaires) qui a la propriété de réguler le recrutement et les fonctions des cellules inflammatoires.

Nos récents travaux publiés ont montré un rôle clé de CD44 dans la mise en place de l'inflammation hépatique. Comme CD44 est exprimée par plusieurs sous-populations de cellules immunitaires, son invalidation spécifique dans chacune des cellules immunitaires que nous proposons d'étudier nous permettra d'identifier celle(s) dont les fonctions seront affectées et leurs rôles respectifs selon

le stade de la maladie. Cela permettra aussi d'identifier des cibles thérapeutiques spécifiques du stade de la maladie. Ces cellules pourraient aussi servir de marqueur de diagnostic chez les patients obèses. Dans ce sens, nos résultats préliminaires montrent que l'inactivation spécifique de CD44 au sein des cellules innées de type 1 (ILC-1) régule le nombre de neutrophiles hépatiques dans notre modèle murin d'alcoolisation chronique et aigüe.

Les procédures expérimentales que nous proposons dans ce projet sont nécessaires et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. En effet, des approches sur cellules isolées ne permettent pas de mimer la physiopathologie de ces maladies retrouvées chez l'homme. Il nous est nécessaire de réaliser des études *in vivo* car les études *in vitro* ne permettent pas de reproduire les interactions complexes qui existent entre les différents organes et entre les différents types tissulaires. Il est à noter que les souris déficientes pour CD44 ne présentent aucun phénotype dommageable comme observé au sein de notre animalerie et comme décrit par notre fournisseur de souris (souris viables, fertiles, de taille normale et ne présentent aucune anomalie physique et comportementale).

Ces études seront réalisées dans le souci d'utiliser un nombre maximum d'animaux (2224 animaux pour toutes les procédures) sans compromettre les objectifs du projet et tenant compte des exigences de remplacement, réduction et raffinement. Chaque procédure utilise un nombre d'animaux minimum mais nécessaire pour réaliser des études statistiques pertinentes. De plus, leur bien-être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures en termes de conditions d'élevage (température, hygrométrie), d'hébergement (présence de tige en coton et d'igloo dans les cages), et de soins afin de réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

10975 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires destinés à être administrés à l'animal de rente, des études de pharmacocinétique sont requises pour justifier du devenir du médicament dans l'organisme (administration-distribution-métabolisation et élimination, ADME).

L'objectif du projet est de définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez l'ovin et le caprin dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs, pour pouvoir établir le profil pharmacocinétique du produit en développement, dans divers tissus, organes et/ou fluides de l'organisme, évaluer la biodisponibilité du produit et/ou déterminer le temps d'attente pour la sécurité du consommateur. Plusieurs études de pharmacocinétique pourront être requises pour répondre à l'ensemble de ces questions selon l'état d'avancement du développement du produit.

Ces informations réglementaires sont obligatoires et indispensables à la constitution du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du produit final. Ces études de pharmacocinétique doivent être conduites dans l'espèce cible.

L'animal est l'ovin/caprin jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études de pharmacocinétique. Le nombre d'animaux inclut dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit et la finalité de l'étude (étude de résidu, évaluation de la biodisponibilité ou du profil pharmacocinétique du produit, bioéquivalence) et dans le respect des textes réglementaires, lignes directrices correspondantes en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 300 animaux de chaque espèce.

Le projet vise à définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez l'ovin/caprin sans compromettre l'atteinte de l'objectif et dans le respect du bien-être animal et des principes de remplacement, de réduction et de raffinement,

- toutes les administrations et prélèvements seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU et aucun d'entre eux n'est susceptible d'induire de dommage ni de souffrance chez l'animal,

- depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,

- les points limites sont toute altération du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit dans les jours suivant la pharmacocinétique ; toute observation laissant présager un début de mal-être est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra examiner l'animal et prendra les décisions adéquates pour sa protection,
- la chronologie des études sera définie de manière à minimiser le nombre d'animaux à utiliser.

Ce projet couvre également le recueil de sang, d'urine ou de fèces dans le but de préparer des matrices témoins requises pour la validation des méthodes de dosage des échantillons générés dans ce projet.

10976 Le fibrome utérin est la tumeur non cancéreuse la plus fréquente chez les femmes en âge de procréer. On estime que de 20 % à 40 % des femmes caucasiennes et jusqu'à 50 % des femmes afro-américaines de plus de 35 ans ont des fibromes utérins. Après 50 ans, cette proportion passe à 70 % chez les femmes caucasiennes et à 80 % chez celles d'origine africaine. Avoir un fibrome utérin n'augmente pas le risque de cancer de l'endomètre (muqueuse utérine).

Ces tumeurs bénignes sont situées sur la paroi de l'utérus (muscle lisse), de façon isolée ou en groupe. Leur taille peut varier de la grosseur d'un pois à celle d'un pamplemousse, voire davantage. Dans la majorité des cas, les fibromes n'entraînent aucun symptôme. Cependant, ils peuvent parfois être très gênants et provoquer des saignements menstruels abondants, toutes sortes de douleurs et des envies fréquentes d'uriner. De plus, les fibromes occasionnent parfois des problèmes de fertilité au vue de leur nombre, localisation ou taille.

Les fibromes étant très vascularisées, une embolisation permet de les nécroser en bloquant l'apport sanguin donc l'angiogenèse et ainsi la croissance de la tumeur. La première embolisation de l'artère utérine (Uterin Fibrome Embolization UFE) a été réalisée en 1995. C'est une alternative prometteuse à la chirurgie qui est invasive et très douloureuse. Cette procédure permet une récupération beaucoup plus rapide pour les patientes et une durée d'hospitalisation plus courte.

L'embolisation est réalisée à l'aide de microsphères de taille supérieure à 500µm. Du fait d'une vascularisation commune des ovaires et de l'utérus, empêchant l'embolisation sélective des fibromes, cette technique est principalement réalisée sur des patientes ne désirant plus d'enfant. Le principal risque associé étant que des microsphères atteignent les ovaires et modifient ainsi la fertilité des patientes.

Ce projet a pour but l'étude de l'utilisation et l'évaluation d'agents embolisants dans cette technique afin de :

- déterminer l'efficacité du traitement,
- préserver la fertilité des patientes.
- trouver le meilleur traitement pour cette pathologie
- évaluer la sélectivité de l'embolisation pour préserver les ovaires.

Le projet sera conduit sur des lapins New Zealand, avec un nombre d'animaux compris entre 100 et 900 pour la totalité du projet (5 ans). Les procédures expérimentales mises en œuvre seront réalisées sous anesthésie et analgésie, gazeuse ou chimique. Les résultats acquis chez un même animal permettront de répondre à plusieurs questions scientifiques (pharmacocinétique, biodistribution, imagerie) afin de raffiner le nombre total d'animaux. Selon la réglementation, nous assurons également un suivi quotidien des animaux permettant d'anticiper l'atteinte d'un point limite et nous avons mis en place un hébergement enrichi selon les normes de la réglementation.

10977 Les micros angiopathies thrombotiques (MAT) sont un groupe de maladies caractérisées par des thromboses microvasculaires conduisant à une thrombocytopénie, une anémie hémolytique et à une fragmentation des globules rouges. Les manifestations cliniques sont fonctions du lieu où se produit la thrombose ce qui conduit à distinguer le syndrome hémolytique urémique (SHU) et le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT). Dans le PTT, se rencontrent principalement des lésions des cellules endothéliales au niveau du cerveau alors que dans le SHU les lésions des cellules endothéliales se retrouvent au niveau des glomérules.

Plusieurs facteurs étiologiques prédisposant à la MAT ont été décrits. La forme post-diarrhéique du SHU est le facteur prédisposant le plus courant. D'autres facteurs ont été décrits comme l'infection par *Streptococcus pneumoniae*, la grossesse, des néoplasies et certaines drogues.

Le SHU est une maladie caractérisée par une insuffisance rénale, une thrombocytopénie et une anémie hémolytique. Il est divisé en 2 types suivant leur étiologie : (i) SHU suite à une infection par un *E. coli* (STEC SHU) produisant la Shiga toxine (STx) ou (ii) SHU atypique. La toxine AB5, une Shiga toxine a été identifiée comme agent causal du STEC SHU. La contamination par STx se fait principalement par ingestion d'aliments contaminés par des *E. coli* ou par des *Shigella dysenteriae* produisant la shiga toxin. Actuellement, il n'existe pas d'options thérapeutiques ayant fait leurs preuves pour le traitement d'un STEC SHU autre que des soins supports. La dialyse peut être un soin de soutien en phase aigüe du STEC SHU et permettre de maintenir en vie le patient mais une insuffisance rénale chronique et une hypertension peuvent se développer chez ces patients. La mise au point d'une véritable thérapie afin de traiter le STEC SHU est nécessaire et primordiale afin de diminuer la mortalité et la morbidité.

Les lésions des cellules endothéliales, comme retrouvées dans le SHU, conduisent à une grande mort cellulaire et à une inflammation importante. De nombreuses études ont souligné le rôle de signaux de danger dans l'induction/ maintien de cette inflammation. Ces signaux de danger sont des molécules libérées par les cellules mortes et détectées par les cellules immunitaires et non immunitaires de l'hôte. Lorsque trop relâchées, ce qui se produit dans le SHU, ces molécules sont délétères pour l'hôte. Parmi ces molécules, les histones ont été décrites comme étant responsables d'effets dévastateurs. Par conséquent, les histones extracellulaires représentent des cibles thérapeutiques pour le traitement de ces pathologies.

Nous avons identifié une protéine plasmatique X sécrétée suite à une inflammation, se fixant sur les histones et empêchant ainsi leur action délétère. Notre projet a pour objectif de déterminer l'implication de X dans la physiopathologie des MAT et plus particulièrement du SHU et son rôle protecteur potentiel. Pour ce faire, nous aimerions suivre l'implication de X dans un modèle *in vivo* de SHU, l'utilisation des animaux est donc indispensable et 268 souris seront nécessaires.

Le but de cette expérimentation animale chez la souris est d'apporter des preuves de l'importance de X dans la survie au SHU. Pour cela, nous allons induire un SHU par injection de Shiga toxine chez 42 souris C57BL/6J sauvages et 42 souris C57BL/6J déficientes en X (42 souris sauvages et 42 souris WT recevront du PBS en contrôle), puis nous induirons de nouveau ce SHU dans 30 souris C57BL/6J sauvages et les compléterons avec X en comparaison à 30 souris sauvages non complémentées. Suite à l'induction du SHU, les souris seront suivies bi-quotidiennement. Pour éviter la souffrance de l'animal au cours du protocole expérimental, des indicateurs comportementaux et physiques prédéfinis (état général, comportement/mouvement, évolution pondérale) seront évalués quotidiennement et constitueront suivant un score les points limites de l'expérience. Notre démarche expérimentale tient ainsi en compte la règle des 3R : réduction du nombre d'animaux par l'utilisation du nombre minimum permettant des statistiques fiables, raffinement du protocole expérimental, pour éviter le stress des animaux de la musique est mise dans la pièce de stabulation, des petites maisonnettes sont présentes dans les cages pour enrichir le milieu, et remplacement des animaux par des expériences *in vitro* préalablement réalisées ayant montré l'implication de cette protéine dans la protection cellulaire contre les histones. Ce projet s'inscrit ainsi dans une gestion éthique de l'expérimentation animale et est donc en accord avec les réglementations européennes et françaises des bonnes pratiques de laboratoire.

10978 Le lupus est une maladie auto-immune (le système immunitaire du patient réagit contre le patient lui-même). Le lupus touche principalement des femmes (90%) en âge d'enfanter et aucun traitement spécifique n'existe encore contre cette maladie. Le lupus affecte le rein chez 30% des patients (néphropathie lupique) et 25% d'entre eux développeront une insuffisance rénale terminale (IRT). Au stade IRT, les reins ne fonctionnent plus du tout, ce qui nécessite une mise sous dialyse dans l'attente d'une greffe de rein. Une fois au stade de l'IRT, la maladie lupique s'éteint progressivement chez ces patients jusqu'à un stade correspondant à une rémission complète.

Le projet vise à identifier les facteurs sanguins et du système immunitaire responsable de l'extinction de la maladie lupique chez ces patients ayant atteint l'IRT. Une fois identifiés, ces facteurs pourront être utilisés comme traitement chez les patients lupiques avant que le rein ne soit atteint par la maladie, évitant ainsi l'IRT et le besoin de transplantation rénale.

Le développement de la maladie lupique est extrêmement complexe et implique de nombreux acteurs du système immunitaire. Notre projet vise d'abord à identifier ces facteurs chez les patients et ensuite les tester comme thérapie dans des modèles de souris développant l'atteinte rénale du lupus avant de pouvoir développer des approches cliniques chez l'Humain.

De par la complexité des maladies étudiées, il n'existe aucune alternative à l'utilisation de modèles animaux développant eux-mêmes la maladie. Ces animaux permettront de valider les nouvelles cibles thérapeutiques identifiées afin de transférer nos découvertes aux patients atteints de lupus.

Les candidats thérapeutiques identifiés seront testés dans deux types de modèles de lupus chez la souris, un modèle spontané (souris Lyn^{-/-}), c'est-à-dire que les souris développent spontanément une maladie ressemblant au lupus rénal, et un modèle induit (pristane). Ce modèle 'induit' correspond à l'injection d'une huile minérale dans la cavité péritonéale des souris qui va induire après une vingtaine de semaine une maladie légère ressemblant au lupus. Les essais précliniques nécessiteront l'administration de ces substances aux souris malades afin d'évaluer leurs potentiels thérapeutiques.

Des modèles murins ayant des modifications génétiques affectant la réponse aux toxines accumulées dans le sang lors de l'IRT (souris AhR^{-/-}) seront utilisés et soit croisés avec les souris développant la maladie spontanément, soit traités au pristane pour le modèle inductible, y compris chez des souris développant plus rapidement la maladie (souris transgéniques pour le CD32A). Confirmer nos données dans deux modèles distincts de la maladie est essentiel pour valider les approches thérapeutiques et pouvoir passer aux essais chez l'Humain. Ces modèles de maladie lupique ne sont pas connus pour induire un stress ou une douleur soutenus des animaux.

Réduction du nombre d'animaux et remplacement des modèles animaux : Le remplacement dans nos études de l'approche par modèle animaux n'est pas possible pour l'étude des mécanismes des maladies complexes comme le lupus. Cependant, l'étude de cellules humaines *ex vivo* et l'analyse des échantillons de patients permet de réduire les hypothèses de travail et ainsi de limiter le recours aux modèles animaux.

Notre projet aura une durée de 5 ans et utilisera un maximum de 460 animaux. Ce nombre est un nombre maximal. Le but des études chez la souris est de pouvoir conclure sur la validité d'une approche thérapeutique pour la pathologie humaine. Sur un plan statistique, afin de pouvoir conclure, 5 animaux par groupe expérimental/contrôle sont utilisés. Si, et seulement si, une tendance justifiant d'être confirmée sur un nombre plus important d'individus est constatée, alors le nombre d'animaux par groupe pourra être amené à 10 maximums. Si la significativité statistique est atteinte, nous ne serons pas amenés à augmenter ce nombre.

Raffinement de la méthodologie utilisée : ne sont testés dans les modèles murins que les cibles identifiées au préalable dans des échantillons sanguins humains.

Des organes (ganglions, rate et moelle osseuse) seront prélevés afin d'établir des cultures primaires de cellules. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, des expériences seront regroupées sur de mêmes individus (une souris contrôle d'une expérience *in vivo* verra ses organes utilisés pour des cultures cellulaires et des expériences *in vitro*). Les interventions sur les animaux vivants se limiteront aux prélèvements sanguins sur animaux anesthésiés (inférieurs à 100 µl et espacés d'au moins deux semaines), à la collecte d'urines suivant la même fréquence et de tissus pour le génotypage, et enfin aux injections des molécules thérapeutiques candidates aux souris.

Aucun traitement induisant la mort ou une souffrance soutenue de l'animal n'est prévu dans le présent projet. Tous les animaux seront observés quotidiennement par le personnel compétent de l'animalerie. A la fin des procédures (40 semaines pour le modèle spontané et 24 semaines pour le modèle induit), tous les animaux seront euthanasiés par inhalation de CO₂ avant prélèvements des organes à analyser. Même si aucune des procédures ne doit induire de souffrance/mal-être

manifeste de l'animal, en cas d'observation de tels signes (inactivité, prostration, déplacement difficile...) les animaux concernés seront euthanasiés immédiatement.

10979 Ce projet vise à développer des approches originales basées sur le principe de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) afin de caractériser le métabolisme cérébral fonctionnel dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson idiopathique (MPI) et d'identifier des marqueurs précoces de la pathologie. La spectroscopie RMN du carbone ^{13}C est une technique d'investigation non irradiante, non invasive, n'entraînant pas de douleur ou de souffrance chez l'animal anesthésié et qui permet d'apprécier le métabolisme cellulaire. Cependant à cause de sa faible sensibilité (l'abondance naturelle du ^{13}C n'est que de 1,1%), ce noyau n'est que peu utilisé en RMN. Depuis quelques années, différentes techniques, dites d'hyperpolarisation, ont été développées pour augmenter le signal RMN de ce noyau. En augmentant d'un facteur supérieur à 10 000 le signal du ^{13}C par ces techniques, il est alors possible d'enregistrer le spectre RMN en une fraction de seconde. Ainsi, nous proposons d'explorer de façon dynamique le métabolisme cérébral et ainsi de caractériser les flux de synthèse métaboliques (cycle de Krebs, cycle Glu/Gln, interactions neurones-glie) à l'état normal et après dénervation dopaminergique.

Pour cela, ce projet se décline en 2 objectifs : (i) hyperpolariser des précurseurs originaux permettant de caractériser le métabolisme fonctionnel et (ii) démontrer leur intérêt lors d'études *in vivo* sur le modèle rat de la MPI.

Pour mener à bien ces objectifs, le choix des précurseurs pressentis (glutamate, glutamine, alpha-cétoglutarate et glucose marqués au ^{13}C) sera validé *in vivo* chez le rat sain. La détection du précurseur dans le cerveau et la synthèse de métabolites dérivés de ce précurseur seront étudiées. Pour cela, un accent particulier sera apporté au mode de préparation des échantillons et aux modalités d'injection afin de détecter le métabolisme *in vivo* au niveau cérébral chez l'animal. 5 rats sains par précurseur seront utilisés pour cette étape de validation.

La capacité d'une molécule à passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) est une étape clé des études sur le métabolisme cérébral. Si l'administration intraveineuse ne permet pas la détection du précurseur marqué au niveau du cerveau, une procédure de rupture de la BHE sera mise en place. Dans ce cas 5 animaux supplémentaires seront ajoutés.

L'application à l'étude du métabolisme fonctionnel cérébral chez le rat, modèle de maladie de Parkinson se fera chez 10 animaux contrôles pour chaque précurseur et sera comparé aux résultats obtenus chez 10 rats modèles de maladie de Parkinson.

Ce projet sur 5 ans sera réalisé sur 105 rats (± 15 rats si l'étape de validation nécessite un protocole de rupture de la BHE).

La règle des 3R (Réduire, Remplacer, Raffiner) sera appliquée conformément aux décrets relatifs à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

L'étude du système nerveux, de par sa complexité d'organisation, de développement, de plasticité et de fonctionnement, ne saurait être envisagé hors du contexte intègre de l'organisme entier. Seules des approches menées *in vivo* chez un modèle animal peuvent améliorer la connaissance du cerveau et de son développement.

Le caractère non-invasif de la méthode RMN chez l'animal anesthésié permet tant que possible des examens répétés chez un même animal, ce qui entraîne une réduction du nombre d'animaux utilisés pour ces développements. Toute intervention chirurgicale sera pratiquée sous anesthésie profonde et des analgésiques administrés en péri-opératoire. Les conditions d'hébergement (plusieurs animaux par cage, stimulation régulière par un expérimentateur), le recours à l'anesthésie pendant les acquisitions et la définition au préalable de points limites permettent de réduire l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'anxiété subis par les animaux.

10980 En France, la maladie d'Alzheimer (MA) et les maladies apparentées, touchent environ 900 000 personnes et altèrent de façon significative la qualité de vie et l'autonomie des personnes atteintes et de leurs familles. Avec le vieillissement de la population et le manque de résultats significatifs des traitements médicamenteux, les maladies neurodégénératives sont devenues un enjeu

prioritaire de santé publique. Les défis actuels se focalisent notamment sur une meilleure efficacité des médicaments en ciblant d'une façon précise le cerveau. De nombreuses stratégies thérapeutiques ont été explorées depuis quelques décennies. Plusieurs obstacles relatifs à la modification de la membrane neuronale avec l'âge et le passage de la barrière hémato-encéphalique rendent difficile l'administration des médicaments dans le système nerveux central. Dans ce contexte, un nombre croissant d'études montre que l'utilisation de nanoliposomes, composés de bicouches lipidiques, pourrait représenter des vecteurs de molécules capables de cibler le cerveau. Par ailleurs ces nanoliposomes possèdent un potentiel neuroprotecteur propre grâce à leur richesse en acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) dont l'importance pour la fonctionnalité neuronale est largement décrite dans la littérature. Nous avons notamment montré que les AGPI n-3 permettaient de restaurer l'efficacité d'une cible thérapeutique anti-Alzheimer chez la souris âgée, suggérant que leur co-administration avec des molécules actives puissent améliorer leur potentiel thérapeutique.

L'objectif de ce projet est d'analyser la biodisponibilité d'acides gras, sous forme de nanoliposomes, après administration par gavage chez la souris, afin de valider, dans un second temps, leur potentiel neuroprotecteur. La dose de nanoliposomes administrée sera validée *in vitro* sur culture primaire de neurones corticaux, grâce à des études de neuroprotection contre la cytotoxicité du peptide Abeta soluble, l'agent précocement impliqué dans la maladie d'Alzheimer (remplacement). La biodisponibilité périphérique et cérébrale après administration par voie orale, ne pourra ensuite être validée que sur un modèle animal. Nous avons donc retenu notre modèle d'étude habituel, le modèle murin pour sa pertinence dans les études nutritionnelles et métaboliques et pour la comparaison aux résultats déjà obtenus. Les nanoliposomes seront destinés à termes, à valider des formulations complexes (nanoliposomes + molécules active) permettant de prévenir ou de ralentir les processus neurodégénératifs et les troubles cognitifs associés chez des sujets âgés. Il est donc indispensable de connaître l'effet du vieillissement sur leur biodisponibilité cérébrale. Ainsi, 50 souris mâles seront utilisées, divisées en deux groupes : 25 souris âgées de 6 mois (souris adultes) et 25 souris âgées de 18 mois (souris vieilles). Une administration par gavage de nanoliposomes, cinq jours sur sept, sera réalisée sur différentes périodes afin d'optimiser le protocole d'administration pour les études ultérieures. Toutes les deux semaines, des prélèvements sanguins seront réalisés sur l'ensemble des animaux en vue des dosages de triglycéridémie et de cholestérolémie. Cinq animaux par groupe (nombre nécessaire et suffisant pour les études statistiques : réduction) seront mis à mort dans le but d'effectuer une analyse de la composition lipidique de différents tissus, en particulier le foie et le cerveau. Cet acte sera effectué en respectant les modalités stipulées par la réglementation en vigueur. L'objectif étant de déterminer la durée minimale de gavage pour obtenir un enrichissement cérébral maximal, plusieurs temps seront testés (2, 4, 6 et 8 semaines). Cela permettra de connaître la durée nécessaire et suffisante pour les études à venir (Réduction). Ce projet ayant également comme objectif d'évaluer l'effet de l'âge sur la biodisponibilité des acides gras administrés sous forme de nanoliposomes, les deux groupes d'âge (6 et 18 mois) seront comparés.

Le bien-être des animaux sera contrôlé quotidiennement et l'inconfort évité au maximum au cours de l'expérimentation, de manière à garantir la qualité des résultats (Raffiner).

En cas de dépassement de l'un des points limites définis (atteinte cérébrale massive constituant une souffrance importante, perte de poids de plus de 20% du poids initial sans récupération au bout de 4 jours, arrêt de la prise alimentaire solide et/ou liquide, état général traduisant une évolution vers la morbidité), les animaux seront mis à mort par une surdose d'anesthésique, leur décès sera vérifié par absence de battements cardiaques.

10981 Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacocinétique, de la toxicologie ou encore de l'efficacité. Ces

études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament et sont donc indispensables.

Le cancer affecte des millions de personnes chaque année. Cette pathologie a donc des impacts sociaux et économiques majeurs sur les patients et le système de santé. Les thérapies actuellement disponibles pour traiter le cancer ont une efficacité limitée pour certaines indications comme par exemple le cancer du pancréas et les effets secondaires des traitements limitent considérablement leur utilisation. Il y a donc un besoin urgent de trouver de nouvelles molécules efficaces ayant un effet anti-cancéreux démontré. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet. Les retombées attendues incluent le screening *in vivo* de nouvelles molécules efficaces, l'étude si besoin de leur mécanisme d'action et l'évaluation des meilleurs candidats avant une éventuelle utilisation en clinique chez l'homme. Ainsi, ces études permettront de trouver potentiellement de nouveaux médicaments dont les effets seraient supérieurs aux molécules de référence déjà existantes.

Pour cela, différents modèles orthotopiques de cancer vont être développés chez la souris ou le rat. Ces modèles animaux sont bien connus et employés intensivement dans la recherche sur le cancer et dans l'industrie pharmaceutique dans l'essai et la validation de nouveaux agents thérapeutiques potentiels. La greffe dite « orthotopique » est une greffe de cellules ou de tissu cancéreux réalisée sur un site correspondant à celui de la tumeur d'origine. Par exemple, un fragment d'adénocarcinome colique sera transplanté sur le colon ou le caecum des animaux.

La technique consiste à injecter une suspension de cellules cancéreuses dans son site d'origine (ici sein, pancréas, foie ou colon). L'utilisation de la souris ou du rat comme modèle d'étude permet de tester le traitement dans un contexte physiologique. Notamment, en fonction de l'origine murine ou humaine des cellules cancéreuses greffées, ce projet sera réalisé sur des souris ou rats immunocompétents ou immunodéficients (pour s'affranchir de l'impact du système immunitaire de l'hôte sur le développement de la xénogreffe de cellules humaines), respectivement. Après un certain temps (dépendant du modèle cellulaire utilisé) permettant à la tumeur de bien s'établir, le traitement de la nouvelle molécule à tester peut commencer afin d'évaluer ses capacités anti-tumorales et/ou anti-métastatiques potentielles. Les composés dont l'efficacité potentielle sera testée dans ces modèles orthotopiques auront fait l'objet auparavant d'études *in vitro* afin de limiter l'expérimentation animale au maximum et de se concentrer uniquement sur les molécules avec une réelle potentialité et/ou pertinentes pour les études mécanistiques.

Pour ce projet, nous pensons effectuer 15 études avec pour chaque étude, l'utilisation de 60 animaux (5 groupes de 12 animaux), soit 900 animaux sur 5 ans. Ceci est une estimation et repose sur l'évaluation de 3 nouvelles molécules thérapeutiques potentielles par an.

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

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour les expérimentations, il a été prévu un nombre suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur l'efficacité du traitement. Ce protocole ne sera mis en place qu'avec des lignées cancéreuses qui auront répondu au traitement lors d'études *in vitro* préliminaires afin de limiter l'utilisation des animaux.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : La procédure d'implantation des cellules cancéreuses se fera sous anesthésie générale. La chirurgie sera effectuée par une personne habilitée et formée. Les animaux seront suivis quotidiennement (5 jours par semaine) pour pouvoir identifier les signes de souffrance caractérisés par le comportement (mobilité, alimentation, agressivité, cris...), le poids du corps (qui sera mesuré 2 fois par semaine) limité à une perte de 20% maximum par rapport au poids initial, l'état du pelage le cas échéant, la consistance des fèces. Si les signes persistent au bout de 24h, l'animal sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié.

- « Remplacer » les modèles animaux : Ce projet se focalise sur un modèle intégré d'étude du développement tumoral et/ou de métastases nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Ce système est indispensable pour reproduire la physiologie d'un organisme entier permettant la formation de la tumeur sur son site d'origine. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant ces

procédures expérimentales. Ce projet nécessite l'utilisation d'animaux pour pouvoir tester l'effet du traitement sur la croissance tumorale dans un contexte physiologique.

10982 L'angioplastie coronaire est une méthode de revascularisation myocardique. Le cœur est un muscle nourri par des artères : les artères coronaires. Si une ou plusieurs de ces artères coronaires sont obstruées, il est important de les déboucher. L'angioplastie coronaire consiste à mettre en place aux endroits rétrécis un ballonnet coulissant sur un guide métallique. Ce ballonnet est gonflé pour dilater l'artère puis dégonflé et retiré. Dans certains cas, une prothèse (stent) peut-être mise en place. La prothèse est un grillage métallique qui est plaqué sur la paroi de l'artère et laissé en place à demeure. Cette technique jusqu'ici totalement « manuelle » était réalisée sous contrôle radiographique et exposait les cardiologues et les patients à de fortes radiations. Dans ce cadre un robot dédié à la cathétérisation a été développé. Il est piloté à distance et permet un geste plus précis, des temps opératoires plus court et donc des expositions aux radiations moins longues. L'efficacité de ce robot a été testée et approuvée dans un modèle porcin. Suite à la validation de son utilisation en clinique, de nombreux centres hospitaliers souhaitent s'en équiper. L'utilisation de ce robot nécessite la mise en œuvre d'une phase de formation *in vivo*. Pour cela le modèle animal recommandé est le porc dans la mesure où son anatomie coronarienne est proche de l'anatomie humaine. Cette formation sera mensuelle elle utilisera 2 porcs afin de former 6 cardiologue par mois sur trois ans soit un total de 72 porcs et 216 cardiologues de formés. Dans le cadre de la règle des 3Rs : Raffiner : la formation *in vivo* ne sera réalisée qu'après une phase de formation théorique et *in vitro* à l'utilisation du dispositif Médical. Les porcs seront prémédiqués de façon approprié et l'ensemble des gestes chirurgicaux seront réalisé sous anesthésie générale monitorée avec analgésie adaptée. La procédure sera sans réveil avec mise à mort par surdose d'anesthésie (confirmé par le monitoring : ECG plat). Les porcs arriveront 7 jours avant l'intervention et seront hébergés en enclos intérieur sur caillebotis plastiques, leur espace de vie sera enrichie par des jouets dédiés type balles à bruit et disque à mordre. L'ensemble de la formation sera supervisé par un référent expert en cathétérisme sur le modèle porcin ainsi que par une infirmière anesthésiste. Réduire : la formation permettra de former 3 cardiologues par porc soit 6 cardiologues par mois. Remplacer : La formation débutera par une prise en mains du robot sur un cœur artificiel. La formation des chirurgiens à l'utilisation de ce robot est essentielle pour l'avenir des patients souffrant de coronaropathie.

Cette demande fait suite à une première demande qui a reçu un avis favorable du comité d'éthique et une autorisation du ministère et qui a aussi validé l'importance de cette formation dans l'utilisation du robot. Etant donné le nombre important des cardiologues à former, il est nécessaire d'organiser une formation par mois en moyenne durant les 3 prochaines années. Ceci explique les 72 porcs sur 3 ans.

10983 L'un des enjeux majeurs en écologie est de comprendre la réponse des organismes aux variations environnementales. Dans cette perspective, la clarification des mécanismes proximaux est une étape indispensable pour prédire des patrons écologiques généraux comme l'utilisation de l'habitat ou la distribution des espèces. Les espèces terrestres ectothermes sont soumises aux contraintes de leur environnement thermique et hydrique. Cependant, les compromis liés à la disponibilité en eau demeurent relativement peu considérés, bien que l'eau soit une ressource capitale pouvant être limitante en particulier pendant la gestation chez les espèces vivipares. Nous avons récemment démontré que la régulation de la balance hydrique joue un rôle clé dans les compromis physiologiques et comportementaux de la mère par rapport aux besoins de ces jeunes chez une espèce commune de lézard, le lézard vivipare (*Zootoca vivipara*). Cette étude était basée sur une simulation expérimentale d'une restriction hydrique en milieu de gestation. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'ajustement de la physiologie, du comportement et de l'effort reproducteur des femelles adultes de la souche ovipare vis à vis de la disponibilité en eau tôt dans la gravidité, à savoir peu après l'ovulation. Ces femelles seront capturées à partir de 6 populations naturelles distribuées le long d'un gradient altitudinal (900 à 1600m) dans le but d'examiner les effets initiaux de conditions climatiques contrastées (température, accès à l'eau, etc.). Les individus sont capturés en nature

afin de quantifier les variations inter-populationnelles de l'état hydrique initial, de la vitesse de déshydratation et le niveau de stress physiologiques liés aux changements climatiques (population à basse altitude exposée à des températures anormalement élevées comparé aux hautes altitudes). Pour ce faire, nous étudierons les effets d'une restriction d'eau modérée (1 seul arrosage par jour contre 3 arrosages par jour) pendant deux semaines juste après l'ovulation (début mai) sur les niveaux de déshydratations (osmolarité plasmatique), de stress hormonal, et sur le comportement de thermorégulation pendant la gestation puis sur l'effort reproducteur (nombre et caractéristiques de jeunes). Nous réaliserons pour cela deux prises de sang par femelles : avant et après l'exposition au traitement afin de déterminer les variations des indicateurs plasmatiques de déshydratation et de stress. Immédiatement après la ponte, les femelles seront relâchées et les œufs seront incubés jusqu'à éclosion des nouveau-nés. Les jeunes nés en captivité seront ensuite relâchés avec leur mère au point exact de capture, les femelles après la ponte et les jeunes après éclosion. La qualité de la descendance est évaluée par les mesures de la masse et de la taille à la naissance. Qui corrèle positivement avec la probabilité de survivre. Notre hypothèse générale est que les conditions hydriques confrontent les femelles reproductrices à des compromis physiologiques plus importants tôt dans la gravidité. Un conflit d'allocation de l'eau entre la mère et ses jeunes sera donc attendu si la restriction hydrique a lieu tôt dans la gestation.

Pour cette étude, nous optimiserons les procédures relatives à l'éthique expérimentale :

- Cette étude a pour objectif l'étude des réponses physiologiques et comportementale du lézard vivipare à une période de restriction hydrique modérée. Bien que nous ne pouvions pas nous soustraire à étudier ces réponses *in vivo*, le nombre d'individus concernés et les procédures expérimentales envisagées demeurent limitées.

- Nous minimiserons les effectifs en limitant l'étude sur un seul sexe (femelles) et une seule classe d'âge (adulte). Cette espèce est particulièrement abondante (> 1000 individus / Ha) et c'est la raison pour laquelle les effectifs de femelles au sein de chaque population ($n=30 \times 6 \text{ pop} = 180$) demeurent très limités (<3% de femelles par population) de manière à ne pas impacter la dynamique des populations tout en optimisant la fiabilité des résultats obtenus par la suite.

- L'hébergement des femelles sera optimal pour cette espèce avec un individu par terrarium contenant un substrat tourbeux, un abri et une coupelle d'eau, et un accès à la nourriture (grillons vivants) tous les 2 jours. Les procédures expérimentales ont de plus été conçues de manière à limiter au maximum les contraintes, la gêne et la douleur subie par les individus. C'est pourquoi nous étudierons les effets d'une restriction d'eau (un arrosage journalier) et non pas une privation totale qui aurait pu impacter la survie des lézards. Nos études précédentes ont démontré que les individus supportent bien (déshydratation et stress modérés) ces procédures expérimentales.

10984 Les maladies inflammatoires et infectieuses touchant le système nerveux central sont actuellement une thématique de recherche majeure puisque de plus en plus de personnes sont touchées par ces maladies. Par exemple, en France, la sclérose en plaques touche 80000 personnes. Des thérapeutiques ont été développées pour prendre en charge les patients mais elles entraînent des effets secondaires graves chez certains sujets comme la leucoencéphalopathie multifocale progressive qui peut conduire au décès du malade ou des cancers. C'est la raison pour laquelle les mécanismes aboutissant à ces pathologies vont être étudiés afin de déterminer de nouvelles cibles pour prendre en charge ces maladies. Ceci est basé sur l'utilisation des modèles animaux (lignées pures génétiquement homogènes, environnement "contrôlé") qui reproduisent en majeure partie les caractéristiques cliniques et histopathologiques des maladies humaines. L'objectif de notre projet est d'étudier les interactions entre les lymphocytes et les cellules endothéliales. Cette étude se fait en utilisant des animaux transgéniques qui expriment l'antigène HA (Hémagglutinine de l'Influenzae virus) au niveau des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique. Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 100 animaux sur 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

1-Remplacement : le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude se fait après de nombreuses études *in vitro* dans des modèles cellulaires montrant l'importance de ces gènes

dans le fonctionnement du système immunitaire. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études *in vitro* ne reproduiraient pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et par conséquent ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine.

2-Réduction : les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. De plus, nous avons également pu valider certaines approches expérimentales *in vitro* permettant d'optimiser l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 10 souris selon les paramètres à évaluer permettent d'acquérir des données fiables.

Raffinement : Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, que nous aurons définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

10985 La prévalence de la stéatose hépatique non alcoolique dans la population générale est estimée à 24%. En raison de la propagation pandémique de l'obésité, la NASH est l'une des causes principales de maladie hépatique.

La NASH est un trouble métabolique se caractérisant par une accumulation progressive de lipides au niveau du foie puis d'un mécanisme inflammatoire associé ou non à une fibrose (cicatrisation des zones lésées du foie+ perte de fonctionnalité). L'étiologie de la pathologie est multifactorielle, les thérapies à mettre en place pour la combattre sont donc nombreuses, et pour les développer nous avons besoin d'avoir recours à des modèles expérimentaux divers.

Pour étudier la maladie, certains modèles sont créés en l'induisant avec un agent chimique, d'autres en reproduisant chez l'animal un trouble métabolique par une alimentation hyper riche.

Les troubles du métabolisme des lipides et des glucides sont intimement liés, les maladies hépatiques métaboliques sont souvent présentes chez les patients insulino-résistants, diabétiques et/ou en surcharge pondérale. Dans notre projet, nous ferons appel à des animaux qui présentent des troubles métaboliques spontanés (animaux mutés). Nous utiliserons des souris qui sont déficientes pour le gène qui code pour la leptine, ce qui les rend insulino résistantes et obèses. Nous les soumettrons à différents régimes alimentaires spéciaux (gras, sucrés et hypercaloriques) qui amplifieront les désordres métaboliques afin d'établir un modèle dans lequel la pathologie s'installera rapidement et qui sera utile pour évaluer les propriétés thérapeutiques des produits que nous développons. Ce projet s'inscrit dans un programme global qui consiste à terme à proposer sur le marché des médicaments pour prévenir, et soigner cette pathologie. Ce besoin médical est clairement exprimé actuellement.

La pathologie d'origine métabolique est multifactorielle, elle ne permet pas d'établir des méthodes alternatives pour l'étudier telle qu'elle se présente chez l'homme. Pour cette raison nous ne pouvons éviter d'avoir recours aux animaux de laboratoire. La gravité des procédures qui seront réalisées dans ce projet sera légère à modérée.

Pour restreindre les nombre d'animaux utilisés, nous ne procédons aux évaluations *in vivo* que des molécules ayant franchi avec succès les phases de sélection effectuées sur des modèles acellulaires ou cellulaires.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. Nous prévoyons l'emploi de 3316 souris au cours de la durée couverte par ce projet.

10986 Les bioprothèses valvulaires d'origine animale constituent un progrès technique fondamental en chirurgie cardiaque. La mise au point des techniques pour leur préservation, qu'il s'agisse de valvules porcines aortiques ou de péricarde bovin, a transformé les indications de remplacement valvulaire en clinique humaine. De nombreuses études ont démontré les avantages significatifs des bioprothèses valvulaires par rapport aux prothèses mécaniques, en particulier la diminution du

risque de maladie thromboembolique et donc l'absence d'utilisation d'anticoagulants avec une morbidité et une mortalité per-opératoire et post-opératoire moindres. Néanmoins, l'une des limitations essentielles à l'utilisation des bioprothèses valvulaires, est la survenue plus ou moins tardive de calcifications ; c'est l'inconvénient majeur nécessitant un nouveau remplacement valvulaire.

Le but de cette recherche est de modifier les traitements de la bioprothèse, afin de diminuer les calcifications qui apparaissent après implantation chez l'homme jeune, et d'améliorer la durée de leur fonctionnement. Ces nouveaux traitements seront testés et analysés après implantation intramusculaire chez le jeune lapin et en implantation cardiaque chez l'agneau.

Afin d'éviter toute souffrance, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec une analgésie pré- et post-opératoire. Des points-limites ont soigneusement été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Pour ce projet, 580 animaux seront nécessaires pour une durée de 5 ans (480 jeunes lapins et 100 agneaux). La diversité des traitements nécessite un grand nombre de groupes tests, dont chacun doit contenir un grand nombre d'échantillons nécessaires pour les études statistiques. Dans l'intention de réduire le nombre d'animaux, chaque jeune lapin recevra 4 à 8 disques de tissu péricardique de chaque côté (droit et gauche). Pour les études chez l'agneau, nous allons réaliser 5 expériences. Pour chaque expérience, 1 groupe contrôle et seulement 3 groupes tests. A l'issue de ce projet, il sera possible de définir le traitement optimal contre la calcification et la dégénérescence des bioprothèses valvulaires et d'optimiser les transplantations d'organes artificiels en chirurgie cardiaque.

10987 Le Syndrome des Jambes sans Repos (SJR) est l'un des troubles neurologiques sensorimoteurs les plus répandus. Il affecte 5 à 10% des adultes dans les pays occidentaux. La maladie peut débuter à tout âge mais la fréquence et la sévérité des symptômes augmentent avec l'âge. Ces derniers apparaissent le plus souvent au moment de l'adolescence puis s'aggravent avec le temps, indiquant une composante développementale mais aussi neurodégénérative. Toutefois, ce syndrome est peu connu et souvent mal diagnostiqué.

Le SJR se caractérise par un besoin de bouger les jambes notamment en période d'inactivité et particulièrement durant la nuit (hyperactivité motrice). Il peut ainsi conduire à des troubles du sommeil impactant la santé physique, mentale ainsi que les interactions sociales. Les symptômes peuvent être temporairement atténués par le mouvement d'où le nom attribué aux patients de « marcheurs nocturnes ».

Il n'existe actuellement qu'un seul traitement pharmacologique, le pramipexole. Ce médicament est un agoniste de récepteurs à la dopamine, déjà autorisé et utilisé chez l'homme pour le traitement de la maladie de parkinson et de la maladie des jambes sans repos. Ce composé se fixe sur des récepteurs à la dopamine, principalement présents dans une région du cerveau dénommée le striatum afin de moduler la communication entre certains neurones (neurotransmission). Dans le cas du SJR, ce « modulateur » a un effet bénéfique chez les patients pendant environ 6 mois, entraînant une réduction des symptômes. Puis le traitement devient inefficace et conduit même à une augmentation des symptômes (dont l'origine reste à ce jour inconnue).

Au niveau biologique, le SJR reste mal compris. Récemment identifiée, la mutation du gène Meis1 serait le facteur de risque génétique principal pour déclarer cette maladie. D'après notre hypothèse de travail basé sur les effets du pramipexole, cette mutation affecterait le développement du striatum.

Le présent projet vise donc à administrer le pramipexole aux souris afin de comprendre les mécanismes de neurodéveloppement et de neurodégénérescence dans le cerveau de souris portant des mutations inactivant le gène Meis1. L'un des objectifs est d'identifier l'impact sur les voies dopaminergiques et le lien avec le phénotype moteur observé. De nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pourraient être mises en évidence dans l'ultime but de proposer des alternatives thérapeutiques plus efficaces.

Des études *in vitro* sont effectuées en parallèle afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Le nombre d'animaux utilisé (groupe de 12) correspond au nombre minimal d'animaux à inclure pour obtenir des données statistiquement exploitables selon les impératifs de réduction. Ces effectifs ont été déterminés d'après les données de la littérature et les procédures en vigueur à l'animalerie.

Toutefois, le modèle murin n'est pas remplaçable et reste indispensable afin d'évaluer l'impact des mécanismes biologiques sur le comportement moteur ainsi que pour étudier les réseaux neuronaux dans leur ensemble.

En vue de raffiner les procédures, les animaux sont hébergés dans des conditions optimales et ils font l'objet d'un suivi adapté et de soins vétérinaires au besoin. Les expériences réalisées ici ne sont pas douloureuses. Elles consistent uniquement en des études comportementales, effectuées avec ou sans injection préalable de composés pharmacologiques. Les molécules pharmacologiques sont utilisées à des doses faibles permettant simplement de révéler des dysfonctionnements ou de limiter/supprimer le phénotype.

Au total, un maximum de 960 souris sera utilisé sur les 5 ans.

10988 La dérivation gastrique ou "Gastric Bypass" en Y (RYGB) est une chirurgie bariatrique (métabolique) qui entraîne non seulement la perte de poids efficace des patients souffrant d'obésité massive, mais aussi l'amélioration de l'équilibre glycémique de ces patients lorsqu'ils sont diabétiques. De façon intéressante, cette correction du diabète de type 2 (DT2) apparaît indépendamment de la perte de poids. Le RYGB consiste à réaliser un court-circuit de l'intestin et de l'estomac qui modifie les mécanismes de l'absorption du glucose par le corps. Cependant les mécanismes conduisant à l'amélioration du métabolisme du glucose après RYGB sont mal définis.

Le mini-porc, a récemment été décrit comme un modèle intéressant du RYGB qui permet d'explorer le rôle de l'intestin dans l'homéostasie du glucose liée aux modifications anatomiques de l'intestin grêle. Plus particulièrement, ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle majeur du sodium dans la modulation de l'absorption intestinale du glucose, notamment après RYGB, impliquant le co-transporteur sodium-glucose SGLT-1. Cependant la taille de l'animal fait défaut pour l'utilisation de la Tomographie par Emission de Positons (TEP). Celle-ci est une technologie de pointe et non invasive pour l'imagerie moléculaire dans les systèmes vivants. Sa haute sensibilité et la résolution spatio-temporelle rendent cette technologie particulièrement utile pour analyser la répartition du glucose dans l'intestin.

Des études cliniques et précliniques (modèle du mini-porc) récentes rapportent des modifications majeures de l'absorption intestinale du glucose après RYGB. Dans l'une de ces études précliniques, il s'est avéré que l'exclusion biliaire d'une partie de l'intestin (anse alimentaire) réalisée lors de la chirurgie du RYGB conduit à une diminution drastique de l'absorption de glucose, concluant à l'effet crucial du sodium contenu dans la bile dans l'absorption intestinale des carbohydrates. Cette étude conclue sur le rôle majeur du contact bile-glucose dans la lumière intestinale décrivant un facteur important dans l'amélioration de la réponse postprandiale au glucose améliorant la glycémie engendrée par la chirurgie métabolique.

Le but de ce projet s'inscrit dans la continuité de l'étude du rôle de l'absorption intestinale du glucose impliquant le co-transporteur SGLT1 dans le RYGB. Par conséquent, nous proposons d'explorer les effets physiologiques du RYGB sur l'absorption intestinale du glucose radio-marqué au fluore (2 deoxy-fluoro-D-glucose, FDG) dans un modèle animal de petite taille : le rat. Dans notre étude, la technologie de TEP sera utilisée afin de suivre en temps réel le processus d'absorption du glucose alimentaire *in vivo*, du tractus gastro-intestinal vers les différents organes périphériques. Dans un premier temps, le profil d'absorption orale de ¹⁸F-FDG sera réalisé, chez le rat non-obèse et non-diabétique (souche Wistar), puis une étude plus approfondie sera réalisée dans un modèle de rat diabétique (souche Goto-Kakizaki) afin de comprendre les effets de changements anatomiques du RYGB dans l'amélioration de l'homéostasie de glucose postprandial impliquant SGLT-1. Les résultats obtenus ici apporteront une nouvelle compréhension du processus de l'absorption

intestinale du glucose par voie orale après RYGB *in vivo*. Cette information est utile pour le développement des molécules thérapeutiques pour le traitement du DT2.

Nous prévoyons d'utiliser au maximum 104 animaux. Ces derniers seront hébergés dans une animalerie conventionnelle, dans des cages respectant les normes en vigueur et la supervision d'un vétérinaire. Toutes les différentes manipulations seront effectuées chez les animaux selon les principes des 3R : 1) Réduction : le nombre d'animaux a été réduit à la plus petite quantité possible après l'application des formules statistiques pour obtenir résultats significatifs. 2) Remplacement : dans l'évaluation des effets de l'absorption intestinale du glucose après la chirurgie, le modèle le plus approprié est le modèle "*in vivo*". À cet égard, l'utilisation de petits animaux est recommandée pour l'expérience TEP. 3) Raffinement : la possibilité de réaliser un échantillonnage dans une séquence longitudinale, chez les rongeurs, garantit l'utilisation des animaux dans tous les processus et en utilisant moins de sujets. Tout stress sera contrôlé lors des expérimentations grâce à une anesthésie générale à l'isoflurane, lors du passage en TEP et lors de la procédure de chirurgie, avec administration d'analgésiques post-chirurgie et l'utilisation d'une procédure d'euthanasie approuvée par la loi en vigueur.

10989 Dans les zones de production fromagère AOP de montagne, il a été noté que le taux de glucides solubles des foins était variable. Les modèles de prévision de la valeur alimentaire des foins n'utilisent pas le taux de glucides solubles, dont l'influence a toutefois été démontrée. Les conseillers en élevage ont donc des difficultés à déterminer la meilleure complémentation en concentré (céréales, protéagineux ...) pour répondre aux objectifs de l'éleveur, à conserver une qualité du lait répondant aux cahiers des charges AOP et s'assurer du maintien en bonne santé de l'animal. Pour cela, 2 concentrés (amidon plus et moins rapidement dégradables) croisés avec 2 foins (riche et pauvre en glucides solubles) seront distribués (soit 4 rations) à des vaches laitières. Chaque ration sera distribuée à 1 lot de 14 vaches laitières en cours de lactation (4 lots au total), soit 56 animaux au total, dont 28 de race Prim'Holstein et 28 de race Montbéliarde, parmi lesquelles 40 multipares et 16 primipares seront réparties équitablement au sein de ces 2 races. Les 2 races et les 2 parités seront réparties équitablement entre les 4 lots. Les vaches seront logées en étable standard (logettes individuelles) et recevront une ration composée de foin à volonté, de regain en quantité limitée, de concentrés en quantité limitée et d'eau à volonté.

Les mesures suivantes seront réalisées sur animaux : production laitière et qualité du lait, ingestion des fourrages, activité de rumination, comportement alimentaire, position de l'animal dans l'étable, métabolites sanguins, composantes chimiques des fèces, poids vif, état d'engraissement et santé des animaux.

L'essai durera 11 semaines et se décomposera en 3 parties :

- 1 période pré expérimentale (3 semaines) : 56 vaches alimentées avec la même ration hors expérimentale permettant le contrôle individuel pour chaque mesure présentée précédemment et la mise en lot
- 1 période de transition alimentaire (2 semaines) : chaque lot sera alimenté avec 1 ration expérimentale. Réalisation de chaque mesure présentée précédemment (hors état d'engraissement)
- 1 période d'essai (6 semaines) : chaque lot sera alimenté avec 1 ration expérimentale. Réalisation de chaque mesure présentée précédemment.

L'ensemble du projet a été réfléchi de manière à respecter la règle des 3R. S'il n'est pas actuellement possible de réaliser ce type de mesures sans passer par l'animal, nous avons néanmoins calculé au plus juste le nombre d'animaux utilisés, de façon à obtenir des données statistiquement valides dans des conditions proches d'un élevage commercial de la zone géographique considérée et avec le moins d'animaux possible.

Par ailleurs, les procédures employées ont été réfléchies de manière à éviter aux animaux la mise en cage individuelle (prélèvement de fèces au rectum, mesure des quantités ingérées par des auges peseuses automatisées) ou de minimiser l'impact du prélèvement (prélèvement sanguin à la queue

moins traumatisant pour l'animal qu'à la jugulaire, prélèvement de lait lors de la traite effectué en routine) afin de limiter la douleur, l'angoisse ou le stress sur l'animal.

10990 L'amélioration du bien-être animal a été jusqu'à présent freinée par la difficulté de mesurer objectivement l'état émotionnel des animaux, en particulier sur de longues durées (semaines/mois/années). La principale approche utilisée jusqu'à présent, est la tâche de biais de jugement, inspirée de la psychologie cognitive. Cette approche a été appliquée avec succès dans diverses espèces y compris les ovins, mais son utilisation est compliquée du fait de l'investissement en temps nécessaire à l'entraînement de chaque individu (plusieurs jours ou semaines).

Une nouvelle approche, récemment validée et inspirée de la neurobiologie du stress, pour mesurer les états émotionnels des animaux en utilisant la neuroimagerie a été développée. En effet, de nombreuses études chez l'homme, les rongeurs et les primates non-humains ont montré que la quantité de matière grise dans une partie spécifique de l'hippocampe est un bon marqueur de l'état émotionnel de longue durée d'un individu et co-varie avec l'exposition répétée de l'individu à des événements stressants ou à des événements perçus positivement. Cette mesure de matière grise peut être réalisée de façon non-invasive chez l'individu en utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Dans ce projet, nous proposons d'utiliser les outils d'IRM développés chez le mouton afin de tester l'hypothèse que cette nouvelle approche peut être utilisée pour mesurer l'état émotionnel de longue durée chez cette espèce. Ainsi nous cherchons ici à savoir si le volume de l'hippocampe est dépendant du niveau de stress. Ainsi, nous mettrons des brebis en situation de stress chronique (par une exposition répétée à des événements stressants et imprédictibles, n=12) ou en hébergement normal (n=12) et après une période de 6 semaines de stress, nous mettrons en relation les changements comportementaux et endocriniens (cortisol) observés avec les modifications volumétriques de l'hippocampe mesurées par IRM.

Ce protocole respecte la règle des 3R :

Remplacement : il n'existe pas d'alternative à l'utilisation d'animaux pour évaluer un phénomène aussi complexe. Il n'existe pas d'alternative pour évaluer l'effet d'un stress sur la morphologie et la structure de l'hippocampe.

Raffinement : Les animaux seront hébergés en groupes sur paille. L'IRM est une méthode non invasive permettant un suivi longitudinal des mécanismes neurobiologiques. Une période de convalescence de 3 mois minimum sera appliquée pendant laquelle les animaux ne seront pas réutilisés dans un autre protocole. Une évaluation comportementale des animaux sera faite à la fin du protocole de stress et à la fin de la période de convalescence afin de vérifier que les animaux ont bien récupéré du traitement.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés (2 groupes de 12 femelles) a été limité au minimum tout en permettant une analyse statistique fiable.

10991 Domaine en rapide évolution, les nanotechnologies ont contribué à d'importantes innovations en matière de thérapeutique, dans l'industrie et l'environnement. En particulier, les additifs de diesel formulés avec des nanoparticules de Cérium (NPCeO₂), actuellement largement utilisés en Europe et aux Etats-Unis en tant que catalyseur de combustion, permettent de réduire la consommation en fuel et les dégagements toxiques des gaz d'échappements. L'augmentation exponentielle des applications des NP amène cependant l'homme à y être exposé par voie respiratoire à des niveaux non négligeables. Les émissions atmosphériques ayant un effet délétère aujourd'hui avéré sur la fertilité, la question de l'évaluation de la balance bénéfique/risque de l'utilisation de ces additifs, et en particulier des NPCeO₂, constitue un questionnement majeur de santé publique.

L'objectif de ce projet est ainsi d'évaluer les effets d'une exposition répétée par voie inhalatoire aux NPCeO₂ sur certains paramètres déterminants de la reproduction. L'impact sur la gamétogenèse et la qualité nucléaire des gamètes, la biodistribution et la biotransformation des NP, ainsi que leur génotoxicité et potentiel oxydatif au niveau des gamètes et des embryons, seront étudiés. Ce projet sera réalisé sur 189 rats, jeunes adultes (61 mâles et 128 femelles). Il comprend 3 procédures expérimentales.

La 1ère procédure explicite les expérimentations de mise au point et de validation des protocoles de test qui seront menées en amont des 2 procédures suivantes.

La 2ème vise à évaluer les effets des NPCeO2 administrées par instillations intra-trachéales (i.t.). Cette méthode d'administration, mimant une exposition par inhalation, permettra dans un 1er temps d'exposer les animaux à une concentration précise de NP. Ils seront pour cela soumis à une instillation i.t. par semaine durant 8 semaines pour les mâles et 4 semaines pour les femelles (périodes correspondantes à la production des gamètes). Les femelles seront ensuite soumises à un traitement visant à stimuler leur production d'ovocytes. Certaines seront alors mises à mort pour réaliser des prélèvements d'ovocytes, les autres accouplées avec les mâles de l'étude pour être fécondées. Après accouplement, ces animaux seront sacrifiés pour le prélèvement des spermatozoïdes et d'organes chez les mâles, et d'embryons et d'organes chez les femelles. Des analyses biochimiques sur les cellules et organes alors prélevés (spermatozoïdes, ovocytes, embryons, organes des systèmes reproducteurs et poumons) permettront de déterminer la toxicité et la biodistribution des NPCeO2.

La 3ème procédure a pour but de déterminer ces mêmes conséquences suite à une exposition plus réaliste, par voie oro-nasale, pour mimer au plus juste les conditions d'exposition humaines. Les animaux seront pour cela exposés à une atmosphère enrichie en NPCeO2 4h/j, 5j/semaine, pendant 8 semaines pour les mâles et 4 semaines pour les femelles. A l'issue de ces périodes, ils subiront les mêmes traitements et analyses que les animaux de la procédure précédente.

Ce projet respecte la règle des 3R au vue des considérations suivantes :

- au plan de la réduction, dans la 2ème et la 3ème procédure, les mêmes mâles seront utilisés pour évaluer les effets des NP sur les spermatozoïdes et l'accouplement pour l'obtention d'embryons. Un grand nombre de paramètres biochimiques et de toxicité seront également analysés à partir des échantillons cellulaires et d'organes prélevés sur ces animaux,

- concernant le raffinement, des enrichissements des conditions d'hébergement des animaux seront mis en place tout au long de l'étude pour assurer leur bien-être. Ils seront ainsi hébergés par sexe à plusieurs par cage pour leur socialisation. Un fond sonore musical sera diffusé la journée pour leur permettre de s'habituer au bruit généré par les manipulations et ainsi limiter le stress pouvant être ressenti durant les expérimentations. Du matériau leur permettant de nidifier et des bâtons en bois à ronger seront également disposés dans leurs cages d'hébergement pour favoriser leur développement cognitif. Le tatouage des animaux à l'oreille pour leur identification sera pratiqué sous anesthésie. Dans la 2ème procédure, les animaux seront anesthésiés préalablement aux instillations i.t. Après chaque administration, ils seront placés sous une lampe chauffante et surveillés jusqu'à leur réveil. Dans la 3ème procédure, des tubes seront disposés dans les cages d'hébergement pour permettre aux animaux de se cacher, et se familiariser avec le dispositif d'exposition par voie oro-nasale. Une semaine avant la 1ère exposition, ils seront placés quotidiennement dans des tubes d'exposition pour leur permettre de s'y habituer. Les tubes seront tapissés de matériaux absorbants pour assurer le confort des animaux. A l'issue de chaque placement dans les tubes, de la nourriture sera également déposée dans leurs cages d'hébergement en guise de récompense,

- pour ce qui est du remplacement, les études cliniques et les méthodes alternatives à l'expérimentation animale, de par leurs limitations éthiques et techniques, ne peuvent pas répondre au questionnement concernant les effets répétés des NP sur l'ensemble des paramètres qui seront analysés, nécessitant de fait le recours aux études *in vivo*.

Tout animal présentant une pathologie pouvant être soulagée recevra un traitement médicamenteux adapté.

10992 Nous étudions les mécanismes qui contrôlent le couplage excitation-contraction l'excitabilité de la cellule musculaire squelettique. Un dérèglement de ces processus peut conduire à une perturbation de l'homéostasie face à laquelle la cellule s'adapte ou subit des altérations pathologiques lorsque les mécanismes protecteurs sont dépassés.

Les objectifs de notre équipe visent donc i) à caractériser ces mécanismes dans le muscle normal et ii) à déterminer le rôle des altérations potentielles de ces mécanismes dans des situations pathologiques rencontrées dans de nombreuses myopathies.

Nos recherches s'appuient sur la mise en œuvre d'outils d'analyse tels que l'électrophysiologie, l'imagerie, la biologie moléculaire ou l'immunocytochimie ... qui toutes servent les approches intégratives.

A ces fins, nous voulons utiliser une technique de transfert transitoire d'ADN permettant d'exprimer une ou des protéines d'intérêt et de comprendre ainsi leur rôle normal ou pathologique. Le transfert est réalisé par électroporation, procédure précédemment utilisée au laboratoire et bien maîtrisée. Elle est réalisée sur un territoire restreint de muscles présents dans la paume des membres postérieurs de souris adulte (c'est-à-dire la face ventrale du pied) et conduit, ponctuellement, *in situ* et *in vivo*, à l'expression des protéines d'intérêts sans que d'autres paramètres comme le degré de maturité cellulaire, la structure tissulaire ou le fonctionnement musculaire ne soient modifiés.

L'intervention sur l'animal consiste à procéder sous anesthésie à des injections sous-cutanées (2 par membre postérieur) et à l'insertion d'aiguilles d'acupuncture faisant office de mini-électrodes, puis à héberger à nouveau l'animal pendant quelques semaines et à réaliser le prélèvement des muscles après mise à mort. L'impact de l'ensemble de la procédure sur l'animal est donc assez faible. Une partie importante des manipulations est ensuite réalisée sur tissus frais, plus précisément sur les cellules musculaires isolées à partir de ces muscles. En moyenne 15% des cellules, appelées aussi fibres musculaires expriment ainsi les protéines exogènes qui sont toutes fluorescentes pour faciliter le repérage des fibres par microscopie.

La durée d'expression, 1 à 10 semaines le plus souvent, est estimée suffisante pour permettre une expression optimale des protéines et la mise en évidence des conséquences cellulaires de cette expression.

Le risque que la modulation d'expression de protéines altère sévèrement la motricité ou la physiologie générale de l'animal est faible, dans la mesure où l'expression du transgène est très restreinte à la fois temporellement et spatialement. Cette expression restreinte et postnatale permet de mieux appréhender le rôle direct de ces protéines sur la physiologie cellulaire de la cellule différenciée.

Différents protocoles complémentaires incluant analysent électrophysiologique, caractérisation des flux calciques, des modalités d'expression et de la signalisation cellulaire permettront d'explorer la physiologie cellulaire des fibres musculaires exprimant la ou les protéines d'intérêts. Les muscles de la paume des membres postérieurs ciblés par la procédure sont suffisamment superficiels pour être accessibles à l'électroporation et comportent des fibres musculaires de petite taille, rendant possible à la fois une isolation aisée des fibres par dissociation enzymatique et un contrôle optimal du potentiel par électrophysiologie.

L'imagerie cellulaire et les enregistrements électrophysiologiques utilisent un appareillage sophistiqué et des protocoles longs appliqués sur une fibre musculaire à la fois. Ainsi, peu de fibres peuvent être étudiées quotidiennement : au maximum, un animal peut par jour participer à une étude donnée, l'équipement permettant au maximum de mener 3 études en parallèle. Compte tenu des différentes études et du taux d'échec prévisionnel, le projet sera mené sur 4 souris par semaine en moyenne, soit 200 souris par an et un total de 1000 animaux sur 5 ans. Les différentes études mises en œuvre dans l'équipe prévoient aussi l'utilisation de modèles d'études en remplacement du modèle souris (cultures cellulaires, poisson zèbre). Le muscle squelettique de souris adulte est cependant le plus pertinent, ses caractéristiques étant suffisamment similaires à celles du muscle squelettique humain adulte pour en constituer un modèle approprié.

Ces recherches ont pour objectif général de mieux comprendre la physiologie du muscle squelettique normal et de caractériser les atteintes pathologiques des mécanismes contrôlant le couplage excitation-contraction et les flux calciques associés et elles pourront aider à ce que des traitements adaptés puissent être ainsi conçus.

Le projet sera mené en prenant en compte le bien-être animal et l'éthique :

- La procédure est réalisée sur animaux anesthésiés, et nos observations précédentes nous ont conduit à inclure une analgésie légère pré et post-opératoire pour maximiser le bien-être des animaux. Un suivi accru des animaux est mis en place pendant les 2 jours suivant la procédure.
- Cette méthode modifie transitoirement le génome d'un faible nombre de cellules musculaires. Elle est donc beaucoup moins délétère qu'une transgénèse à l'échelle de l'organisme entier.
- Le nombre d'animaux sera le minimum raisonnable pour démontrer statistiquement la confirmer ou infirmer les hypothèses. La réutilisation d'animaux ayant participé à une étude non invasive est envisageable.
- Contrairement par exemple à une lignée transgénique, tous les animaux soumis au transfert transitoire de gène intramusculaire constitueront des animaux expérimentaux.
- Aucun test invasif ne sera réalisé sur les animaux.
- Toutes les mesures possibles seront prises pour maximiser le bien-être et limiter le stress, l'anxiété et la souffrance des animaux.

10993 Au cours de la dernière décennie, les insecticides néonicotinoïdes (néonics) ont été utilisés intensivement dans de nombreux pays. Les études chez l'animal suggèrent que les néonics peuvent être toxiques pour le système nerveux et qu'une exposition à ceux-ci favorise la croissance de tumeurs du foie et cause des défauts de reproduction. Il est important de noter que le potentiel de perturbation endocrinienne des néonicotinoïdes n'est pas encore connu. Les données sur les effets spécifiques du thiaclopride sur le cerveau, le foie et les organes reproducteurs, la glande mammaire, les testicules et l'ovaire ne sont pas bien comprises. Il manque également les données des effets de l'exposition pendant le développement embryonnaire. Nous supposons que les néonics pourraient être des perturbateurs endocriniens. Notre objectif global est d'identifier la base moléculaire du mécanisme de l'action du thiaclopride pour créer une vue intégrative des effets des néonicotinoïdes. Dans notre étude nous évaluerons les effets du thiaclopride, un néonicotinoïde couramment utilisé. L'étude intégrative sur le thiaclopride augmentera la compréhension du risque associé à son exposition et aidera à développer les approches préventives pour limiter son impact sur l'environnement et sur la santé humaine. Notre étude mettra en évidence le risque potentiel de l'utilisation du thiaclopride sous sa forme actuelle dans l'agriculture. La dose quotidienne autorisée pour le thiaclopride pourrait être reconsidérée sur la base de nos données. Nous fournirons nos données aux organismes autorisés pour prendre les décisions correctes.

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R :

-Remplacement : des études préliminaires ont été réalisées sur modèles *in vitro* et nous ont permis de définir la molécule à tester (parmi 8 autres) et d'estimer une échelle de doses en évitant d'atteindre une dose potentiellement toxique pour l'organisme. Cependant, les études de connexion des systèmes de reproduction, nerveux et de désintoxication ne sont possibles que dans des organismes entiers tels que les modèles animaux. Les cellules cultivées à partir d'organes ne peuvent pas refléter les véritables relations hormone-dépendantes comme c'est le cas dans le corps entier.

-Réduire : Le nombre d'animaux est choisi en fonction du nombre nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable pour valider les données obtenues à la fin de la procédure. Une expérience pilote sera réalisée sur un nombre limité d'animaux afin de mieux définir la dose à investiguer pour la suite de nos études. Pour ce projet nous prévoyons un maximum de 572 souris, mâles et femelles.

-Raffinement : Les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure le suivi quotidien. L'hébergement se fait dans des cages de groupes de 2-3 animaux. Les procédures sont réalisées par un personnel expérimenté. La molécule thiaclopride est diluée dans de l'huile et administrée avec une sonde adaptée ; Un anesthésique local est utilisé pour le prélèvement sanguin. L'état général des animaux est évalué quotidiennement et des points limites sont préalablement définis.

10994 Les maladies inflammatoires métaboliques comme le diabète de type-2 et l'obésité sont généralement associées à une accumulation excessive de lipides dans le foie et à une dyslipidémie systémique. Cette dyslipidémie s'installe suite à une insulino-résistance au niveau du tissu adipeux, où l'action physiologique de l'insuline est de limiter la lipolyse et de réguler les taux de lipides circulants. Il est également connu que l'état de jeûne induit une insulino-résistance transitoire dans les dépôts viscéraux de tissu adipeux et augmente la lipolyse dans les adipocytes (les cellules graisseuses). L'accumulation anormale de lipides est connue pour induire un stress inflammatoire qui contribue au développement de l'insulino-résistance dans d'autres tissus, pour induire l'épuisement des cellules productrices d'insuline (cellules bêta du pancréas) et pour conduire au développement du diabète de type 2. Il est bien établi aujourd'hui que les cellules immunitaires (notamment les macrophages tissulaires et les monocytes circulants) jouent un rôle clé dans la mise en place du diabète, de la dyslipidémie associée et des complications vasculaires et hépatiques du diabète. Cependant les acteurs moléculaires sont moins bien connus. Récemment, suite aux études bio-informatiques nous avons identifié 5 protéines comme des modulateurs potentiels de la polarisation inflammatoire des macrophages dans la pathogenèse du diabète de type 2. Leurs rôles dans l'inflammation induite par les troubles métaboliques (par exemple la dyslipidémie) restent énigmatiques. Par ce projet nous souhaitons cribler ces 5 protéines pour déchiffrer leurs rôles dans les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement de la dyslipidémie induite par l'insulino-résistance du tissu adipeux et mettre en évidence leurs influence dans le développement du diabète de type 2 et l'inflammation métabolique. Pour ce criblage, nous allons appliquer un modèle murin d'invalidation ponctuelle induite par la technologie 'Cas9' couplée à l'activité enzymatique de recombinaison génétique 'Cre'. Ces souris seront mises sous régime riche en graisse et soumises à des tests métaboliques afin d'évaluer l'homéostasie glucidique suite à l'invalidation des cibles à cribler spécifiquement dans les cellules myéloïdes (progénitrices des macrophages et monocytes). Des données préliminaires (non-publiées) chez l'homme démontrent une dérégulation de l'activation de nos cibles, confortant fortement notre hypothèse de travail.

L'utilisation de modèles animaux est indispensable et n'a encore jamais été réalisée dans notre contexte d'étude. C'est pourquoi nous devons développer et caractériser de nouveaux modèles murins, portant les modifications génétiques appropriées. Ces approches nous permettent de mimer les pathologies humaines et cela nous aidera à déchiffrer les mécanismes biologiques liés au diabète. La stratégie des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée, par exemple pour les études cellulaires nous allons remplacer les modèles murins par l'utilisation de lignées cellulaires, les mêmes souris seront utilisées pour plusieurs projets d'équipe afin de réduire le nombre total de souris en expérimentation. De plus, l'invalidation ponctuelle par Cas9-Cre consommera beaucoup moins de souris par rapport aux modèles classiques de déficience génique (systèmes de Cre-Lox) qui demandent une longue période de 'backcross' de plusieurs générations de souris pour établir une lignée consanguine. Les animaux sont acclimatés à l'animalerie et sont habitués à être manipulés avec un suivi de poids hebdomadaire qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux.

Nombre d'animaux utilisé : 240 souris (20 souris par groupe et par condition expérimentale)

Protocole expérimental : criblage et étude du phénotype métabolique et inflammatoire des souris invalidées pour des cibles potentielles au niveau des macrophages et monocytes (Cas9-KO) sous régime normale ou riche en graisse.

10995 La large diffusion de l'emploi de la toxine botulique (BTX) en stomatologie et neurologie (traitement des trismus et spasticités) pose la question des complications osseuses de ce produit en clinique. En effet la toxine botulique qui provient d'une bactérie (*Clostridium botulinum*) est une neurotoxine qui induit une inhibition de la synapse neuro musculaire ce qui a pour conséquence une paralysie musculaire réversible dans le temps. La propriété de cette toxine a été utilisée dans des modèles expérimentaux pour étudier la perte osseuse liée à l'immobilisation ou à l'hypogravité mais aussi pour étudier les conséquences d'une utilisation clinique en stomatologie et neurologie. Nous avons montré qu'une injection unilatérale de BTX dans les muscles masticateurs principaux chez le rat induisait une perte osseuse mandibulaire du côté injecté, un mois après l'injection de BTX, associé

à une amyotrophie sévère des muscles injectés. De façon inattendue, nous avons observé systématiquement l'apparition d'une zone d'hypertrophie osseuse à l'enthèse du muscle accessoire digastrique sur l'hémi-mandibule droite comparativement au côté gauche non injecté utilisé comme témoin. La formation osseuse à l'enthèse peut être comparée au processus de réparation de fracture osseuse dans lequel une phase inflammatoire initiale précède une réponse tissulaire avec apposition osseuse. Nous avons émis l'hypothèse que la pathophysiologie de la néoformation à l'enthèse pourrait être due à l'augmentation des contraintes mécaniques agissant sur le muscle accessoire digastrique pour compenser la perte d'activité des deux principaux muscles masticateurs. Cette hypothèse est également proposée dans des pathologies inflammatoires des articulations telles que la spondyloarthrite. Nous avons donc proposé ce modèle pour étudier les caractéristiques physiopathologiques de la réponse tissulaire consécutive à une inflammation à l'enthèse comme dans la spondyloarthrite.

Dans la spondyloarthrite, l'un des principaux médiateurs de l'inflammation à l'enthèse est l'Interleukine IL-23. Cette cytokine induit la production d'IL-17A responsable de l'inflammation et de l'ossification ce qui suggère une implication de l'IL-17A dans la formation osseuse à l'enthèse. Un anticorps anti IL-17A (secukinumab) existe pour le traitement de certaines maladies inflammatoires telles que la spondylarthrite ankylosante. Les effets sur la prolifération osseuse à l'enthèse n'ayant pas été exploré et les mécanismes conduisant à une inflammation puis à une prolifération osseuse étant peu connus, le projet vise à mieux comprendre le développement de la prolifération à l'enthèse et à tester l'anticorps secukinumab dans le modèle d'injection de BTX dans les muscles masticateurs. Nous analyserons l'inflammation et la prolifération osseuse à l'enthèse du muscle digastrique à 2 temps différents post injection de BTX afin de comprendre les mécanismes de développement à l'enthèse et nous analyserons les effets d'un anticorps anti IL-17A administré 2 fois par semaine par la voie intrapéritonéale et pendant 31 jours. Nous utiliserons des techniques de microtomographie X et d'immunohistochimie. Notre projet implique l'utilisation de 48 rats.

Concernant les mesures qui seront prises pour l'application de la règle des 3 R :

- Le remplacement : les études sur les interactions musculo squelettiques ne peuvent être réalisées que chez l'animal car elles nécessitent d'avoir des pièces squelettiques entières en interaction avec les muscles avec lesquelles elles sont rattachées. De plus le développement de la néoformation à l'enthèse est lié à des modifications de contraintes mécaniques sur différents muscles et seule une étude animale peut permettre de comprendre ces interactions et d'évaluer l'effet de traitements. Le choix de l'espèce est conforme à un grand nombre d'études sur l'os ; le rat est en effet une espèce reconnue pour l'appréciation de la perte osseuse liée à différents facteurs locaux ou environnementaux.

- La réduction : l'effectif de chaque groupe est celui minimal pour obtenir des informations valides et des tests statistiques performants. D'autre part le modèle en lui-même de paralysie sur un côté, outre le fait de s'affranchir d'un technique chirurgical, permet à ce qu'un même animal soit son propre témoin (côté paralysé versus non paralysé) et d'ainsi éviter d'avoir des groupes supplémentaires témoins.

- Le raffinement : Il sera appliqué en effectuant l'administration intramusculaire de BTX sous anesthésie générale. Cette procédure n'étant pas douloureuse, une analgésie légère sera appliquée uniquement si nécessaire. La gestion du bien-être animal sera assurée par un habitat optimisé en petits groupes de 4 animaux par cage et enrichi avec un tunnel pour rongeur par cage. Les animaux seront surveillés tous les jours et seront pesés une fois par semaine. Une liste de points limites et une grille d'évaluation de la sévérité des réactions non-désirées ont été établies afin de s'assurer du bien-être des animaux.

10996 L'apparition de métastases constitue un mauvais pronostic dans le traitement du cancer par la plus grande difficulté à intervenir chirurgicalement et à éradiquer les cellules métastatiques par chimio- ou radiothérapie. La compréhension des mécanismes de genèse de ces cellules demeure prépondérante dans la lutte contre le cancer et dans la réduction de la mortalité. L'échappement des métastases du site tumoral primaire requiert de la part de la cellule cancéreuse des capacités fonctionnelles et métaboliques nouvelles pour disséminer dans l'organisme. Ces propriétés

émergentes conduisent à des modifications de la composition lipidique et pourraient impliquer l'enzyme du métabolisme lipidique Elov15. Des études *in vitro* suggèrent un rôle de Elov15 dans le contrôle de fonctions associées à la progression tumorale et à la formation de métastases suite à des changements de composition lipidique. Notre projet vise à tirer avantage du modèle murin de cancer mammaire spontané avec métastases MMTV-PyMT pour déterminer le rôle de Elov15 dans le processus tumoral et métastatique. Ce modèle murin génétiquement modifié MMTV-PyMT exprimant l'antigène moyen viral T dans les cellules mammaires reproduit les caractéristiques physiopathologiques observables chez les patientes atteintes d'un cancer du sein avec métastases pulmonaires. Le croisement entre les souris MMTV-PyMT et les souris déficientes en Elov15 (Elov15 KO) permettra d'étudier la capacité de cette enzyme à moduler la croissance tumorale mammaire et la production de métastases pulmonaires.

Remplacement : L'utilisation de ce modèle murin de cancer est nécessaire car la progression tumorale et le processus métastatique sont des mécanismes complexes ne pouvant être modélisés *in vitro*. En effet, la capacité de dissémination des cellules cancéreuses par la voie sanguine et de colonisation des tissus pulmonaires ne peut s'observer que dans un modèle animal. Ainsi, les similarités physiologiques et métaboliques entre la souris et l'Homme permettront de transposer les résultats obtenus à la situation des patients atteints de cancer. Réduction : Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, nous avons déterminé l'effectif nécessaire par groupe en s'appuyant sur notre expérience antérieure en prenant en compte la variabilité interindividuelle et à l'aide d'un outil statistique prédictif permettant d'obtenir un résultat fiable et analysable. Raffinement : Les souris soumises à cette procédure expérimentale seront maintenues en groupe pour favoriser la socialisation et placées dans un environnement calme avec enrichissement structural du milieu permettant la construction de nid. Les souris seront maintenues sans traitement antalgique pour ne pas interférer avec la réponse inflammatoire et éviter des modifications de croissance tumorale. Elles seront surveillées quotidiennement et tout signe de douleur ou souffrance conduira à leur mise à mort. Au total, 120 souris femelles sur un fonds génétique C57/Bl6 seront utilisées

10997 Le trouble comportemental en sommeil paradoxal anticipe d'une décennie la maladie de Parkinson. D'après la littérature récente, ces pathologies sont dépendantes de mécanismes pathologiques impliquant une protéine, l'alpha-synucléine, devenant à un moment donné neurotoxique. Pendant le sommeil paradoxal, nous sommes naturellement paralysés. Or, cette paralysie est absente chez les patients atteints de ce trouble. Son étude constitue donc une priorité pour le comprendre, le traiter et tenter de prévenir la maladie de Parkinson. Nous faisons l'hypothèse que la zone cérébrale contrôlant la paralysie du sommeil serait une cible précoce des processus pathologiques dépendants de l'alpha-synucléine. Ils se propageraient ensuite à l'ensemble du cerveau provoquant la maladie de Parkinson. Notre objectif est de tester l'hypothèse de la relation causale et temporelle liant le trouble comportemental en sommeil paradoxal à la maladie de Parkinson par une approche expérimentale chez la souris et de valider ainsi un modèle animal reproduisant fidèlement la chronologie des processus pathologiques décrits chez les patients.

Un prérequis à ce projet ambitieux est d'obtenir la preuve de concept qu'il est possible chez la souris d'induire une synucléinopathie localisée provoquant d'abord le trouble comportemental en sommeil paradoxal puis se propageant ensuite dans le cerveau. Pour cette phase « pilote » motivant la présente demande d'autorisation, notre stratégie consistera à infuser dans la zone cérébrale cible le vecteur pathogène incriminé (ou la protéine normale comme contrôle). Sur des souris traitées, nous analyserons longitudinalement le cycle veille-sommeil, la survenue de mouvements anormaux pendant le sommeil paradoxal et l'activité locomotrice pendant l'éveil sur une période post-traitement théorique de 6 mois. Celle-ci sera dans les faits déterminée grâce au suivi longitudinal et l'évolution quotidienne de constantes physiologiques, locomotrices et comportementales. Ainsi, les expérimentations seront stoppées dès l'apparition de perturbations caractéristiques chez les rongeurs du trouble comportemental en sommeil paradoxal que nous avons récemment définies. Parallèlement à ce volet physiologique et comportemental, un volet anatomo-pathologique sera conduit sur d'autres lots de souris pour déterminer l'existence effective d'une propagation intracérébrale de la pathologie, de mesurer sa vitesse de propagation, identifiées les voies

nerveuses de propagation et enfin les zones cérébrales impactées pouvant expliquer les troubles fonctionnels éventuels observés. Pour cette phase « pilote », il est prévu d'utiliser 85 souris mâles adultes, réparties en 9 lots expérimentaux, de type naturel (n=70 en 6 lots) et transgénique (n=15 en 3 lots).

Il est évident que nous répondrons explicitement aux principes et exigences des 3R :

Remplacement : L'intérêt d'étudier ces mécanismes physiopathologiques réside dans leur caractère prédictif et évolutif vers une maladie de Parkinson. Il est d'évidence impossible d'aborder ces questions chez l'homme (sain ou malade), d'autant qu'aucun marqueur spécifique de la protéine impliquée n'est encore validé en neuroimagerie. Des travaux anatomo-pathologiques sont réalisés sur des biopsies de patients décédés mais des décennies après le déclenchement des processus pathologiques. Aussi, des modèles précliniques sont requis pour reproduire les observations chez les patients, les comprendre et les modéliser pour l'élaboration de stratégies préventives ciblées. Nos travaux seront conduits chez la souris, une espèce adaptée aux études nécessitant un suivi longitudinal (faible prise de poids et de volume corporel avec l'âge). La petite taille du cerveau garantit un délai d'envahissement cérébral raisonnable d'après des études récentes. Enfin, les réseaux neuronaux responsables du sommeil paradoxal que nous ciblons sont communs aux mammifères, incluant les rongeurs et l'homme, et aujourd'hui bien identifiés.

Réduction : Le nombre d'animaux prévu est légitimé par l'organisation de l'étude autour de deux volets expérimentaux (physiologique et anatomo-pathologique) indépendants mais conduits en parallèle et des paramètres testés (un vecteur d'induction et un vecteur contrôle ; étude longitudinale ; animaux de type naturel et transgénique). Il tient compte des « erreurs et échecs » aux différentes étapes des procédures appliquées aux animaux. Chaque animal ne sera soumis qu'à une seule et unique procédure expérimentale avec mise à mort requise pour les analyses anatomo-pathologiques du cerveau, éliminant toute possibilité de réutilisation. La petite taille respective des 9 lots expérimentaux a été calculée de manière à ne pas compromettre les objectifs scientifiques et la significativité des données (petits échantillons).

Raffinement : Du principe même de cette phase « pilote », il est attendu dans un délai à précisément déterminer par les expérimentations, que les souris développent un trouble comportemental en sommeil paradoxal reflétant l'étendue de l'atteinte cérébrale. Aussi, notre préoccupation sera d'analyser quotidiennement l'évolution longitudinale des paramètres physiologiques considérés et le comportement locomoteur des animaux traités pour détecter au plus tôt les perturbations caractéristiques décrites récemment par nos soins de ce trouble comportemental chez les rongeurs. Celles-ci constitueront de fait le point limite des expérimentations avec mise à mort des animaux, tout en établissant la preuve de concept cherchée par cette phase pilote de notre projet scientifique. Par notre expérience d'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques, nous sommes conscients que l'étude du sommeil qui constitue notre corps de métier au laboratoire requiert des animaux constamment placés dans les meilleures conditions psycho-physiologiques. Les conditions d'élevage, de soins post-opératoires, d'hébergement et les procédures expérimentales sont d'ores et déjà maîtrisées. Les expérimentations seront réalisées par des personnels compétents, formés et suivis dans leur carrière dans le cadre de leur formation continue l'expérimentation animale.

10998 Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité globale, avec plus de 17% des décès qui leur sont imputables (Organisation Mondiale de la Santé, 2012).

En France, parmi les 150000 décès d'origine cardiovasculaire chaque année, 27% sont associées à un infarctus du myocarde et 23% à l'insuffisance cardiaque (Société Française de Cardiologie, 2015). A l'échelle mondiale, plus de 17 millions de décès sont directement imputable à ces maladies, dont 7 millions à l'infarctus du myocarde.

Au cours de l'infarctus du myocarde l'obstruction partielle ou totale des artères coronaires limite l'apport en oxygène et en nutriments du tissu cardiaque et entrave son bon fonctionnement ; c'est la phase dite « ischémique ». La première action thérapeutique est alors hospitalière et consiste à déboucher la ou les artères obstruées afin de permettre la ré-oxygénation du cœur ; c'est la phase de « reperfusion ». Afin de limiter les conséquences délétères de cet épisode, un traitement

chronique est prescrit au patient afin de protéger au long terme la fonction cardiaque. Malgré un arsenal pharmacologique en progrès, de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes restent nécessaires.

Notre Recherche pharmacologique se concentre aujourd'hui sur la manière de protéger la fonction cardiaque afin de prévenir ou de freiner l'évolution de sa dégradation au cours du temps. Elle vise également à prévenir ou traiter les différents facteurs de risques (hypertension artérielle, diabète, dyslipidémie), réduisant ainsi la probabilité de survenue de ces événements cardiovasculaires.

Le ou les candidats médicaments sont d'abord sélectionnés à l'issue de nombreuses études *in vitro* et *ex vivo* au cours desquelles ils auront démontré une puissance et une sélectivité optimales sur la cible envisagée. L'étape suivante consiste ensuite à administrer le produit *in vivo* d'abord dans un modèle rongeur puis dans un modèle animal « large espèce », chez le porc, afin de confirmer d'une part la bonne tolérance du candidat médicament mais également son efficacité à prévenir ou ralentir le remodelage et la dysfonction cardiaque « post-infarctus ».

Dans ce contexte le recours à l'utilisation de l'animal permet de reproduire le tableau clinique le plus prédictif et ainsi récapituler l'ensemble des phénomènes complexes impossibles à modéliser à l'échelle informatique, biochimique et cellulaire. Avec une taille, un métabolisme et une anatomie/physiologie cardiovasculaire proche de l'Homme, le modèle porcin est particulièrement adapté dans le cadre de nos Recherches visant à évaluer l'efficacité d'un candidat médicament à protéger la fonction cardiaque « post-infarctus ».

Expérimentalement, l'infarctus sera induit au cours d'une phase chirurgicale, sous couverture anesthésique et analgésique, par voie endovasculaire (*i.e.* via l'artère carotide), à l'aide d'un ballonnet d'angioplastie ou d'un ressort hélicoïdal (ou coil), utilisé dans les services de neurochirurgie pour « boucher » un compartiment endovasculaire (tels qu'un anévrisme intracranial).

Après une phase de surveillance et de traitement post-opératoire, les animaux seront sélectionnés, sur la base de critère cardiovasculaire écho-cardiographique standard et inclus dans l'étude pharmacologique (avec candidat médicament et/ou traitement de référence). Un suivi des animaux durant quelques mois sera effectué pour caractériser la dysfonction cardiaque mise en place ainsi que pour valider les effets bénéfiques des traitements.

Tout au long du projet les animaux seront suivis (par les expérimentateurs et le personnel de la zootechnie). Les signes cliniques liés à leur pathologie pourront être soulagés autant que possible et dès leur apparition par administration d'un traitement diurétique. Si malgré ce traitement les signes cliniques prédéfinis comme points limites venaient à être atteints, les porcs seraient immédiatement retirés de l'étude. Pour satisfaire au bien-être des animaux, les boxes seront enrichis d'une litière végétale et leurs aliments seront dispersés afin de stimuler leurs instincts de fouissage. Des balles de jeux et des éléments à mastiquer seront également mis à disposition des animaux afin d'améliorer leur confort. Ils seront également maintenus par deux dans chaque boxe pour maintenir un lien social permanent.

Nous estimons un nombre maximum de 211 porcs nécessaires à la conduite des deux procédures décrites dans ce projet sur une période de 6 mois.

10999 Les lymphomes sont des hémopathies qui correspondent à la transformation tumorale des lymphocytes B ou T. C'est actuellement le 6ème cancer le plus fréquent en France et le premier chez les adolescents et jeunes adultes (15 – 25 ans). Les lymphocytes B sont les plus fréquents (85% des cas), et deux présentations cliniques sont classiquement distinguées : d'une part les lymphomes indolents, comme les lymphomes folliculaires (FL), caractérisés par une évolution clinique lente mais inexorable, et d'autre part les lymphomes agressifs, comme les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL), caractérisés par un retentissement clinique important, mais potentiellement curable avec des chimiothérapies intensives. Parmi les lymphomes agressifs, le lymphome primitif du système nerveux central (PCNSL) est un sous-type rare, associé à un pronostic particulièrement sombre.

Le concept de médecine personnalisée appliqué à l'oncologie propose que l'on choisisse le médicament en fonction des anomalies moléculaires de chaque tumeur. Cette démarche a démontré son potentiel dans certaines maladies (comme la leucémie myéloïde chronique ou le mélanome). Cependant, il existe un fossé entre notre connaissance (quasi exhaustive) des anomalies moléculaires des cancers, et notre capacité à transformer ces données descriptives en traitements efficaces. C'est pourquoi la recherche s'oriente désormais vers la compréhension des conséquences des mutations sur le fonctionnement de la cellule cancéreuse.

Nous avons choisi de porter nos efforts sur le gène suppresseur de tumeur BTG1, car d'une part l'inactivation de ce gène est un événement fréquent dans les lymphomes et en particulier les PCNSL, mais également car cette inactivation a une valeur pronostique défavorable, suggérant qu'il est impliqué dans le développement et la réponse thérapeutique des lymphomes. Enfin, les fonctions de ce gène restent encore largement inconnues.

Ce projet permettra par conséquent de mieux comprendre le fonctionnement du gène BTG1 et de mettre au point de nouveaux outils thérapeutiques ciblés qui pourraient être rapidement utilisés en clinique.

L'objectif de cette demande est de générer des modèles de lymphome dont le gène BTG1 est inactivé. Nous croiserons les souris n'ayant pas le gène BTG1 avec des souris qui ont une tendance à développer des lymphomes, afin d'analyser les conséquences de l'inactivation de BTG1 sur le développement de la maladie. Dans une seconde partie nous modifierons génétiquement des cellules de souris surexprimant un gène bloquant la mort cellulaire afin d'invalider le gène BTG1 pour observer des modifications dans la vitesse d'apparitions des lymphomes. Nous essayerons donc de statuer si une délétion du gène BTG1 entraîne ou non une augmentation du développement de lymphomes.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit à son minimum (380 souris), sans compromettre les objectifs du projet tout en permettant une exploitation statistique des résultats. Le mécanisme d'action de BTG1 sur le développement de différents types de cancer a été mis en évidence de nombreuses fois *in vitro*, et doit maintenant être validé *in vivo* sur modèle murin afin de statuer sur le rôle suppresseur de tumeur de ce gène. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées dans le respect du bien-être animal, ceci afin de limiter au maximum les souffrances subies par l'animal. Des points limites adaptés associés à des procédures de surveillance des animaux ont été définis afin de limiter toute souffrance animale. Durant toute la procédure expérimentale, les animaux seront anesthésiés à l'isoflurane ou par une injection de Kétamine et de Xylazine pour réduire au maximum la douleur.

11000 La vaccination classique utilise la voie parentérale pour l'administration de l'antigène. Cependant, cette voie ne procure qu'une immunité partielle (production d'anticorps au niveau sanguin). La voie muqueuse (pulmonaire, orale, vaginale, buccale...) est une voie intéressante car les muqueuses sont la porte d'entrée de la majorité des pathogènes et la vaccination par cette voie permet l'induction d'une double immunité dans le sang et dans les muqueuses.

C'est pourquoi ce projet vise à développer un patch de vaccination par voie muqueuse et plus précisément par voie sublinguale. Ce patch biodégradable est composé de polymères naturels mucoadhésifs pour vectoriser un antigène protéique et une molécule immunostimulatrice.

Les antigènes modèles utilisés dans ce projet sont des protéines issues du VIH et de la grippe pour la preuve de concept. Ces protéines seront incorporées dans le patch de polymères sous forme libre (protéine seule) ou absorbées à la surface de nanoparticules pour mimer leur présentation naturelle à la surface des virus.

L'efficacité vaccinale des patchs nécessite une approche *in vivo*. Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de ce projet car il requiert l'analyse de la production des anticorps. De plus, nous souhaitons identifier les réponses immunitaires engagées de manière générale, tant au niveau sanguin que cellulaire. C'est pourquoi le modèle murin, qui est un modèle bien caractérisé et facilement manipulable, est nécessaire. Toutefois, il est à noter que de nombreux tests préliminaires (cytotoxicité, mucoadhésion, relargage de

l'antigène) ont été effectués ou sont prévus sur différents modèles *in vitro* et *ex vivo* (Remplacement) dans le but de réduire le nombre d'animaux de l'étude.

Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a donc été réduit au minimum (1230 sur 5 ans) sans compromettre l'analyse statistique de nos résultats (Réduction). Ce projet comporte une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par un personnel compétent ainsi que la mise en place de protocoles permettant de réduire la souffrance de l'animal (ajout d'anesthésiant avant les prélèvements sanguins rétro-orbitaire, anti-inflammatoires administrés post-injection si inflammation, doliprane...) (Raffinement).

11001 Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par l'accumulation de mutations dans leur génome. Ce phénomène est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du côlon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite de l'inactivation du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable de la réparation des erreurs produites pendant la réplication de l'ADN.

L'objectif de ce projet est d'étudier les conséquences du traitement par DAP, une molécule qui permet le by-pass des mutations tronquantes qui, le plus souvent, induisent la perte de la fonction de la protéine mutée. Ce traitement pourrait permettre la synthèse d'une protéine sauvage à partir d'un ADN muté. L'enjeu pour la recherche sur le cancer est majeur car les mutations tronquantes touchent la plupart de protéines dites « suppresseur de tumeur » dont leur mutation est donc oncogénique pour la cellule. Nous utiliserons une lignée cellulaire qui porte une mutation tronquante du gène suppresseur de tumeur p53.

Le projet consiste donc à xéno greffer des cellules issues de lignée cellulaire portant une mutation non-sense du gène suppresseur de tumeur p53. A la suite de la prise de greffe les souris seront traitées par DAP. La progression tumorale sera évaluée à l'aide des mesures de la taille de la tumeur avec un pied à coulisse.

Nous voulons ainsi démontrer que le traitement des souris xéno greffées et traitées par DAP, auront une diminution de la croissance tumorale des greffons grâce à la réexpression du suppresseur de tumeur p53.

Ce projet impliquera l'utilisation de 120 souris immunodéficiences. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment. Il repose sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement tumoral qui est au cœur de ce projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

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

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

11002 Le cancer du foie constitue la deuxième cause mondiale de morts liées au cancer. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) en constitue la forme primitive la plus fréquente avec environ 500000 nouveaux cas/an. Il survient sur des foies malades, touchés par des hépatites virales ou toxiques (alcool) ou des foies gras à cause de maladies métaboliques (obésité en particulier). Le pronostic du CHC reste très sombre avec un taux de survie à cinq ans n'excédant pas 20%.

La chirurgie est le principal traitement curatif mais seule une minorité de patients (<40%) peut en bénéficier et le traitement palliatif du CHC non opérable n'a qu'une efficacité très modérée avec seulement quelques mois de survie supplémentaire. D'autre part ce cancer est presque toujours détecté tardivement et il n'existe pas encore d'outils diagnostiques sensibles et fiables qui permettraient de détecter les malades précocement. Il paraît donc essentiel de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués afin de trouver de nouveaux outils diagnostiques et de nouvelles pistes thérapeutiques.

Nous travaillons sur la mutation génétique la plus fréquente dans le CHC humain qui conduit à l'activation d'un oncogène à laquelle 30% des CHC sont imputés. Nous avons développé deux modèles murins qui permettent de reproduire cette pathologie et d'étudier soit les événements pré-tumoraux soit les tumeurs. Nos études sur ces modèles et des études sur des prélèvements de CHC humains nous ont permis d'identifier les modifications d'expression de plusieurs gènes qui pourraient être responsables des altérations de mécanismes cellulaires conduisant au développement tumoral. En invalidant ces gènes dans nos modèles génétiques et dans des modèles d'induction chimique ou alimentaire reproduisant l'étiologie du CHC chez l'homme, nous pourrions analyser leur implication dans la survenue et la progression des CHC et nous espérons trouver des pistes diagnostiques et thérapeutiques.

Règle des 3R :

Remplacement : notre projet s'appuie sur des premiers résultats *in vitro* et sur un précédent projet *in vivo* qui a été agréé d'un point de vue éthique, il n'existe pas de technique permettant de remplacer l'expérimentation animale pour étudier le développement tumoral qui est le résultat d'interactions complexes entre la tumeur, son tissu d'origine et son environnement.

Réduction : les procédures expérimentales ont été réfléchies afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés tout en permettant une analyse statistique valable. Nous prévoyons l'utilisation de 2407 animaux pour mener à bien ce projet.

Nous ne créerons pas de nouvelles lignées et nous utiliserons une technique innovante et validée *in vivo* qui permet d'invalider un gène sans créer de lignée. Avec cette nouvelle technique seuls les animaux d'expérimentation subissent l'invalidation génétique ce qui réduit considérablement le nombre d'animaux générés.

La réalisation d'une biopsie à un stade précoce puis d'échographies permettent un suivi longitudinal du développement tumoral et limitent aussi le nombre d'animaux utilisés.

Concernant le raffinement : Du fait de notre expertise pour les modèles murins de CHC (15 ans de recherche dans ce domaine) nous connaissons la phase possiblement délétère après une invalidation génique dans le foie, elle concerne environ 25% des animaux et nous pouvons l'anticiper. Pour les études sur l'initiation tumorale les animaux seront sacrifiés pour simple prélèvement d'organe avant cette phase. Pour l'étude des tumeurs nous réaliserons une surveillance adaptée et/ou une biopsie hépatique qui permettent d'anticiper cette phase et de sacrifier les animaux pour leur éviter de souffrir. Le suivi du développement des tumeurs dans un centre d'échographies expert permet d'éviter la souffrance due à un développement tumoral important mais aussi de réaliser les études à des stades appropriés sur de petites tumeurs. La douleur et le stress seront évités en anesthésiant les animaux pour effectuer les échographies, les injections intraveineuses et les prélèvements sanguins et en utilisant des antalgiques lors des protocoles de chirurgie. Les protocoles d'induction de tumeur hépatique que nous utilisons sont soit génétiques, soit chimiques, soit alimentaires et notre expérience préalable ne montre pas de souffrance spécifique liée directement à ces protocoles, avant que les tumeurs ne se développent, à l'exception du cas de figure décrit plus haut (modèles d'invalidations géniques). En conclusion, notre hypothèse est que les gènes que nous souhaitons inactiver dans le foie ont une importance

cruciale dans sa cancérisation. Ils pourraient donc être la source de pistes thérapeutiques ou d'outils diagnostiques. Cette étude est rendue cruciale par le fait que le CHC manque cruellement d'options thérapeutiques à ce jour.

11003 Le foie est un organe majeur dans la régulation du métabolisme. Chez l'Homme comme chez la souris, il stocke des nutriments sous diverses formes, et joue un rôle de tampon dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Les individus obèses ont tendance à développer une stéatose, c'est-à-dire à présenter une forte accumulation de graisses dans le foie. Cette pathologie est de plus en plus répandue, dans le contexte d'épidémie d'obésité mondiale actuelle. Une trop forte concentration d'acides gras dans le foie perturbe son fonctionnement, et les protéines impliquées dans le métabolisme constituent de bonnes cibles pharmacologiques pour le traitement de la stéatose.

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs) sont des récepteurs nucléaires capables de réguler l'expression de nombreux gènes du métabolisme lorsqu'ils sont activés. D'autre part, la résistance à l'insuline joue un rôle majeur dans la survenue de maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète et la maladie du foie gras.

Dans ce projet, nous souhaitons approfondir les connaissances sur l'implication des PPARs et du signal insuline sur le métabolisme énergétique, principalement au niveau du foie. Pour cela, nous utiliserons des souris dont les gènes PPAR α , PPAR β , PPAR γ ou une partie du récepteur à l'insuline (P110) ont été invalidés par ingénierie génétique, soit au niveau de tout l'organisme, soit au niveau hépatique spécifiquement. Les institutions internationales recommandent de prendre en compte l'effet du sexe dans les pathologies métaboliques puisqu'il existe chez l'Homme un fort dimorphisme sexuel. Nous étudierons donc le rôle des PPARs dans les 2 sexes.

Ces souris, en comparaison d'animaux contrôles de type sauvage, seront soumises à diverses conditions afin d'étudier le rôle des PPARs :

- lors de régimes plus ou moins riches en sucres, en graisses, en protéines (mimant une carence en protéines), en cholestérol, et en choline et méthionine (régimes induisant une stéatose hépatique) ainsi que lors du jeûne et de la restriction calorique (dans cette partie nous étudierons également le rôle du signal insuline)
- lors de l'administration d'activateurs des PPARs,
- lors d'un afflux d'acides gras provenant du tissu graisseux et dans la production de chaleur.
- dans la protection de l'organisme vis-à-vis des agressions extérieures (inflammation mimée par des molécules synthétiques).
- enfin, nous évaluerons l'impact de la flore intestinale sur l'activité des PPARs en administrant à ces animaux des antibiotiques réduisant fortement cette flore.

Ces différentes conditions devraient modifier la sensibilité à l'insuline chez ces animaux. Nous mettrons en évidence ces perturbations en réalisant des bilans sanguins.

Des analyses de pointe (transcriptomiques, lipidomiques, biochimiques et métabolomiques) seront réalisées sur des prélèvements post-mortem de différents tissus (foie, tissus adipeux brun et blanc).

Nous utiliserons uniquement des souris adultes. Nous prévoyons d'utiliser, à raison de 12 animaux par groupe, par sexe et par lignée, et au vu du nombre d'études à mener, 6816 animaux sur 5 ans. Basé sur les données de la littérature et des expériences antérieures du laboratoire, ce nombre d'animaux est le nombre minimum nécessaire mais suffisant afin d'obtenir des résultats exploitables.

L'utilisation de l'animal entier est indispensable car le projet porte sur le dialogue entre plusieurs organes dans la régulation des voies métaboliques. De plus, la souris est un modèle de choix car adapté aux mécanismes que nous étudions et qui nous permet d'invalider une protéine d'intérêt dans un organe en particulier. Ainsi nous ne pouvons pas utiliser de méthodes de remplacement comme alternative pour cette étude. Nous veillerons au bien-être des animaux tout au long des expérimentations en leur assurant les meilleures conditions d'hébergement, dans un environnement contrôlé, une surveillance par le personnel soignant et des enrichissements du milieu de vie

(cabanes inox et ouate dans les cages). Afin de limiter toute apparition de souffrance animale au cours de ces études, nous appliquerons les mesures de raffinement suivantes : application de crème anesthésiante à usage local pour les prélèvements sanguins, tapis chauffant lors des anesthésies générales, lampe chauffante après l'exposition au froid et respect d'un temps d'habituation des animaux à l'expérimentateur.

11004 Le diabète est une maladie qui touche environ 350 millions de personnes dans le monde dont près de 3 millions en France. Il existe principalement deux types de diabète : le diabète de type 1 et celui de type 2.

Le diabète de type 1 représente environ 10 % des cas de diabètes en France et dans le monde. D'après nos études récentes chez l'homme, des anomalies apparaissent sur certaines populations de cellules du système immunitaire chez les patients diabétiques. L'objectif de ce projet est donc de maintenir un élevage de souris transgéniques qui développent un diabète de type 1 accéléré, indispensable à l'étude des populations de cellules et leurs rôles dans le diabète. Effectivement, il est nécessaire d'utiliser le modèle animal afin de comprendre les interactions entre les différents organes et les mécanismes développés par l'organisme au cours de la maladie. Le diabète de type 1 est analysé grâce à cette lignée de souris transgéniques qui développent spontanément cette maladie. Nous maintenons nos lignées en élevage interne en prenant soin de produire le nombre minimum d'animaux nécessaires au maintien de ces lignées et aux expérimentations. Les animaux sont euthanasiés et seront donneurs de cellules immunitaires, pour induire un diabète chez le receveur.

Ce projet prévu pour 5 ans nécessitera au total 200 souris.

La procédure expérimentale a été élaborée de manière à utiliser le moins d'animaux possibles mais qui permettra d'obtenir une production suffisante de donneurs de lymphocytes T auto-réactifs contre les cellules bêta du pancréas.

Pour cette procédure, le bien-être des animaux est surveillé et de l'enrichissement est ajouté dans leurs cages.

Ce projet permettra de mieux comprendre les interactions et les rôles des cellules du système immunitaire dans le diabète de type 1 afin de pouvoir par la suite, élaborer une thérapie efficace et moins contraignante pour les patients.

11005 Nous souhaitons transmettre à de jeunes chercheurs les toutes dernières connaissances concernant le rôle de la microglie dans le phénomène d'inflammation neuronale au cours de traumatisme crâniens en comparaison à une inflammation neuronale induite par une infection bactérienne périphérique, tout cela par le biais d'une formation pédagogique et technique intensive.

Chaque année 1,5 millions d'européens sont victimes d'un traumatisme crânien, le plus souvent subit lors d'un accident de la route, d'une chute ou au cours de pratiques sportives. 70000 personnes perdent la vie des suites de ce traumatisme et environ 100000 ne présentent pas de récupération totale et demeurent handicapés, notamment chez les enfants et les jeunes adultes qui représentent une population particulièrement vulnérable au regard de ce type de traumatisme. Bien qu'au cours des dernières années un raffinement des procédures de prise en charge par les urgences et les hôpitaux a permis de réduire la mortalité liée aux traumatisés crâniens, il est apparu qu'un grand nombre de patients souffrent par la suite de désordres centraux chroniques tels que : épilepsie, dépression, démence progressive, etc. À ce jour, aucun traitement ne permet d'empêcher la mise en place de telles pathologies à la suite d'un traumatisme crânien.

Une meilleure connaissance du traumatisme crânien passe par une étude approfondie des mécanismes d'inflammation neuronale qui le succèdent. La session de formation propose à la fois des conférences par des chercheurs reconnus spécialistes dans ce domaine et des enseignements pratiques pour apprendre à maîtriser les nouvelles techniques utilisées dans le cadre des études sur les traumatismes crâniens.

Pour parachever cet objectif, nous nous appuyons sur l'utilisation d'un modèle murin de traumatisme crânien peu invasif, nous permettant d'étudier sur le court terme les processus de

neuroinflammation et de dégénérescence au niveau du système nerveux central avec une définition encore inaccessible chez l'homme. L'appui du très utilisé modèle d'induction périphérique de neuroinflammation par infection bactérienne, nous permettra de comparer les comportements et mécanismes microgliaux impliqués avec ceux impliqués dans le traumatisme crânien.

Cette formation-étude nécessite l'utilisation d'animaux car l'établissement d'un modèle de traumatisme crânien ne peut pas être reproduit *in vitro* sur des lignées de cellules, rendant impossible le remplacement par celles-ci. Les procédures expérimentales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et qui soient susceptibles d'apporter le même niveau d'information. En effet, les cellules microgliales, une fois mises en culture, se modifient physiquement par l'induction de gènes non spécifiques de la microglie.

Afin de respecter la règle des 3R, une même souris sera utilisée pour mesurer plusieurs paramètres lorsque cela sera possible. Des procédures opératoires seront développées de façon à réduire au maximum l'inconfort de l'animal. Il est important de noter i) qu'il nous est nécessaire de démontrer les techniques puis de les faire pratiquer par les étudiants, nous ne pouvons donc pas travailler avec moins d'animaux ; ii) que les méthodologies utilisées dans ce projet impliquent la mise en œuvre de toutes les stratégies expérimentales et pharmacologiques disponibles actuellement pour réduire le nombre d'animaux utilisés mais aussi minimiser les possibles effets délétères pour ceux-ci, avec un respect particulier de la notion de points limite (critères d'interruption en cas de souffrance des animaux) ; iii) que ce projet a pour but de former les étudiants afin qu'ils soient en mesure de réaliser au mieux les procédures qu'ils auront apprises et transmettre ainsi ces techniques dans leur laboratoire d'origine. Une meilleure connaissance des modèles de traumatisme crânien et des techniques d'identification de neuroinflammation leur permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés lorsqu'ils voudront réaliser ces techniques pour les besoins de recherche.

Ce projet sera réalisé sur des souris C57BL/6J sauvages et/ou génétiquement modifiées (exprimant une protéine fluorescence verte dans les cellules gliales cérébrales, non dommageable pour l'animal) -tous sexes confondus- (100 souris par formation) à raison d'une fois par an sur une durée de 5 ans (soit 500 souris total).

Le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en œuvre uniquement par du personnel technique et de recherche formé et qualifié et respectant la règle des 3R. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet et des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux.

Ceux-ci ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux. Toutes les précautions possibles (anesthésie, enrichissement des cages d'hébergement) seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux.

11006 La leucodystrophie métachromatique est une maladie neurodégénérative conduisant à une perte de myéline (isolant de la gaine nerveuse) conduisant à des symptômes très sévères chez le jeune enfant avec une dégradation très rapide dans les 6 mois suivant les premiers symptômes et un décès des patients dans les 2 ans maximum.

Il n'existe à l'heure actuelle pas de traitement pour les formes symptomatiques de la pathologie pour lesquels nous souhaitons développer une approche.

Préalablement nous avons établi une preuve de concept de l'efficacité de la thérapie génique dans le modèle murin de la pathologie avec un vecteur adéno-associé (AAV) administré en intracérébral. Ceci a conduit à un essai clinique chez l'homme mais l'expression de la protéine (ARSA) n'est pas suffisante. C'est pourquoi aujourd'hui nous souhaitons évaluer de nouveaux vecteurs qui passent la barrière hématoencéphalique après administration intraveineuse et devraient permettre une expression de la protéine dans l'ensemble du système nerveux central et périphérique. Cette étape se fera tout d'abord chez la souris avec une étude en pré et post symptomatique afin d'évaluer un bénéfice thérapeutique.

Remplacement : Pour le réaliser, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle *in vitro* ou de culture cellulaire ne permet aujourd'hui d'étudier les symptômes de cette maladie mais aussi les marqueurs moléculaires et cellulaires. De plus, la souris est un modèle déjà utilisé et bien étudié, du fait des similitudes avec la pathologie humaine.

Raffinement : En cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance. Notre modèle ne présente de plus pas de phénotype dommageable.

Réduction : Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de virus à injecter, les temps d'analyses. Ils ont également montré que l'étude de groupes de 15 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 165 souris. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux et la moelle épinière prélevés pour éviter des doublons des procédures expérimentales.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux.

11007 Récemment a été démontré que le système immunitaire joue un rôle important dans la réponse à la chimiothérapie via l'activation de la mort cellulaire immunogène. De plus, certains médicaments anti tumoraux conventionnels peuvent générer une réponse immunitaire anti tumorale participant de façon synergique à l'efficacité thérapeutique. Le but de ce projet consiste à évaluer comment les traitements immunogènes peuvent activer le système immunitaire dans le lymphome anaplasique à grandes cellules. Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale dans des systèmes *in vitro*. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris immunocompétentes (n=2880) et immunodéficientes (n=390), accessibles dans le commerce et qui présentent un phénotype complètement normal. Ce projet se dessine sur 5 ans et implique des expériences de croissance tumorale et vaccination. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum* ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

11008 Les hémopathies malignes sont des cancers développés à partir de cellules du sang. Ces hémopathies malignes sont dues à des altérations des cellules du sang qui interviennent à différents stades de leur maturation et provoquent leur prolifération anormale. Le lymphome à cellule du manteau (LCM) constitue ~ 6% des Lymphomes Non Hodgkinien et, malgré des progrès thérapeutiques, reste caractérisé par un des plus faibles taux de survie au sein des lymphomes B (5 à 7 ans). La progression du LCM est associée à une dissémination précoce et l'expansion des cellules tumorales est supportée par plusieurs microenvironnements (organes lymphoïdes secondaires, moelle osseuse, système gastro-intestinal). Le myélome multiple (MM) est caractérisé par une prolifération clonale, dans la moelle osseuse, de cellules plasmocytaires, dérivées de lymphocytes B, qui produisent une immunoglobuline monoclonale. Cette accumulation de cellules malignes produit des lésions dans de multiples régions du corps contenant de la moelle osseuse,

comme les os plats. Les cellules myélomateuses s'accumulent progressivement dans la moelle osseuse, étouffent les cellules normales et s'accompagne de :

- Un fonctionnement anormal de la moelle osseuse qui peut se traduire par une anémie, une diminution des globules blancs
- La sécrétion d'une protéine anormale, monoclonale,
- Une altération du fonctionnement du système immunitaire avec une susceptibilité accrue aux infections
- D'une atteinte des os contenant de la moelle osseuse avec une augmentation de la résorption ostéoclastique et d'une inhibition de l'ostéoformation, d'où le risque de fractures.

Le myélome multiple est responsable de 1 à 2 pour cent de tous les décès liés au cancer dans les pays occidentaux.

Nous proposons de tester de nouvelles molécules ou les meilleures associations de médicaments sur différentes lignées cellulaires. Ce travail s'appuiera notamment sur nos collections bien caractérisées de cellules humaines de MM et de LCM reproduisant l'hétérogénéité moléculaire et les différentes sensibilités rencontrées en clinique pour ces deux pathologies, et qui représentent un outil unique pour étudier l'efficacité de molécules dans ces pathologies *in vitro*. Or afin d'étudier l'efficacité de nouvelles molécules sur ces pathologies dans un organisme complexe, la modélisation de ces pathologies *in vivo* est nécessaire.

Ce projet utilisera au maximum 6300 souris sur 5 ans (étant dans l'impossibilité de prévoir le nombre de contrats obtenus par an, ceci est une estimation très haute). Avant d'évaluer leur efficacité, les nouvelles molécules sont testées pour leur toxicité, seules ou en association :

Tolérance en administration répétée : 24 souris par molécule testée (4 groupes, 6 souris par dose), 10 molécules maximum testées par an sur 5 ans : 1200 souris.

Une fois la tolérance des molécules établie, elles sont évaluées pour leur efficacité, seules ou en association sur des modèles de xénogreffe sous-cutanée.

Modèle de xénogreffe sous-cutanée : 96 souris par molécule testée maximum (8 groupes de 12 souris : contrôle, molécule de référence, molécule à tester à 3 doses maximum, association molécule de référence et molécule à tester à 3 doses maximum), 10 molécules maximum testées par an sur 5 ans : 4800 souris

Validation de nouveaux modèles de MM et de LCM (sous-cutanés)

Nos collections de lignées de cellules humaines de MM et de LCM sont bien caractérisées et couvrent la diversité de ces maladies. A ce jour, seuls quelques modèles de MM ont été transposés *in vivo*. Nous serons donc amenés à développer les modèles de tumeur correspondant aux 10 lignées de MM restantes ainsi qu'aux 10 lignées de LCM de notre panel pour tester les nouvelles molécules.

Pour ce faire nous injecterons différentes quantités de cellules tumorales (avec ou sans matrigel) en sous-cutané, sur souris immunodéprimées. Pour réduire le nombre de souris utilisées nous utiliserons les flancs droit et gauche des souris. Pour chaque lignée : 5 souris par quantité, 3 quantités de cellules testées (volume 100ul), avec (flanc droit) ou sans matrigel (flanc gauche) soit 15 souris.

Pour 20 lignées : 300 souris

Afin de répondre à la règle des 3R, toutes les études *in vivo* seront précédées d'une étude *in vitro* sur un large panel de lignées cellulaires afin de sélectionner le(s) modèle(s) et de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'étude de ces nouvelles molécules ou associations de médicaments. Le raffinement de ce projet se fera par le suivi quotidien des souris selon une grille de score permettant d'évaluer le degré de douleur et d'y remédier avec un traitement analgésique approprié. Par ailleurs, les souris sont groupées à 5 par cage avec des petits morceaux de papiers leur permettant de faire un nid.

11009 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui survient avec l'âge et qui affecte presque 8% des personnes de plus de 60 ans. La maladie se caractérise par une difficulté à initier les mouvements et s'avère très invalidante pour les patients et leur entourage. Un traitement existe pour cette maladie, mais il occasionne des effets secondaires qui deviennent très invalidants après seulement quelques années de traitement. Il y a donc des recherches actives pour trouver de nouveaux traitements permettant de freiner l'évolution de la maladie et ainsi en diminuer les symptômes. Dans ce contexte, notre laboratoire est expert dans l'étude de la nutrition comme un facteur primordial pour maintenir le cerveau en bonne santé et notamment prévenir les troubles neurodégénératifs avec l'âge. Dans la littérature scientifique, la vitamine A, une vitamine indispensable présente dans les produits animaux, apparaît comme pouvant jouer un rôle important dans la maladie de Parkinson, mais les mécanismes sont encore peu connus. Avec l'âge, l'organisme métabolise moins bien la vitamine A, ce qui conduit à une carence en vitamine A pour les organes cibles tels que le cerveau. Ainsi, la carence en vitamine A survenant avec l'âge pourrait être un facteur important pour le développement de la maladie de Parkinson.

Notre projet vise à comprendre comment une carence vitamine A peut contribuer à la survenue de la maladie de Parkinson. Pour cela, nous utiliserons des rats mâles de laboratoire nourris avec un régime standard ou carencé en vitamine A, dès leur sevrage à l'âge de 3 semaines. Le rôle de la vitamine A sera également étudié en re-supplémentant la moitié des animaux 15 semaines après le début de la carence. Les capacités motrices des animaux seront évaluées tout au long de l'étude par des tests simples n'induisant pas de douleur. A la fin des expériences, les animaux seront sacrifiés pour étudier par biochimie, biologie moléculaire, histologie et électrophysiologie l'impact du régime en vitamine A sur les réseaux cérébraux impliqués dans la maladie de Parkinson. Cette étude multi-approche apportera des connaissances importantes sur l'implication de la vitamine A dans la physiopathologie et l'étiologie de la neurodégénérescence liée à la maladie de Parkinson.

Ce projet est fondamentalement un projet de physiologie intégrée étudiant l'impact de la nutrition sur le fonctionnement cérébral, il n'existe donc pas de méthode alternative ou substitutive adaptée aujourd'hui. En effet, les cellules en culture ne forment pas de réseaux de neurones représentatifs de la réalité physiologique et nous n'avons pas encore suffisamment de données dans la littérature pour utiliser des modèles computationnels. De plus, les approches expérimentales sont trop invasives pour être effectuées chez l'Homme.

Un nombre de 10 animaux par groupe et par expérience a été déterminé comme étant le minimum requis pour atteindre une puissance statistique suffisante. Ainsi, 220 animaux seront utilisés au total sur une durée de 4 ans. Les animaux seront hébergés par paire avec un congénère et ils bénéficieront d'un enrichissement comportemental dans leur cage. Leur état de santé sera vérifié quotidiennement et ils seront pesés une fois par semaine. Malgré toutes les précautions prises, si un animal présente des points limites à un moment de l'étude, comme une diminution du poids de plus de 20%, il sera euthanasié pour éviter toute souffrance.

Cette étude de recherche fondamentale apportera des connaissances importantes sur l'implication de la vitamine A dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson et pourra ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter la maladie et/ou en ralentir la progression.

11010 La pénurie d'organes destinés à la transplantation a conduit depuis de nombreuses années à trouver des solutions alternatives, dont celle de la xéno-transplantation de tissus/organes animaux pour des patients humains. Cependant, les problèmes immunologiques majeurs liés à ce type de transplantation ne sont pas encore résolus et l'utilisation d'organes humains compatibles reste l'approche la plus adaptée et fiable. Aujourd'hui la production d'organes humains semble être possible grâce à une méthodologie faisant intervenir le chimérisme interspécifique. En 2013, il a été montré qu'il était possible de produire dans une souris un pancréas de rat fonctionnel et transplantable grâce à l'injection de cellules pluripotentes de rat dans un blastocyste de souris invalidé pour le gène Pdx1 à l'origine de la formation du pancréas au cours du développement. Ces résultats nous ont incité à développer ce projet visant à mettre en place ce type de développement avec des cellules humaines afin de produire un mini pancréas humain chez la souris et faire la preuve de concept qui pourrait par la suite permettre de produire un organe humain fonctionnel

transplantable chez de plus gros animaux comme le porc, le mouton ou la chèvre. Ce chimérisme inter-espèces entre l'homme et la souris est déjà très couramment utilisé pour modéliser un certain nombre de pathologies et envisager des phases précliniques avant des essais de thérapie cellulaire chez l'homme. Ainsi des cellules souches hématopoïétiques sont injectées dans des souris afin d'étudier les paramètres contrôlant la transplantation de moelle osseuse. Ces modèles chimériques sont cruciaux pour la recherche et la possibilité de créer des organes humains chez la souris sans passer par la greffe permettrait d'étudier de nombreux mécanismes encore non accessibles car uniquement testables chez l'homme.

Nous avons donc choisi d'utiliser le modèle de souris disponible, invalidé pour le gène Pdx1 (les souris homozygotes KI/KI sont ainsi incapables de développer un pancréas et meurent à l'état embryonnaire). Notre étude consiste en l'injection de cellules iPS naïves humaines dans des blastocystes de souris et au transfert de ces embryons dans des femelles pseudogestantes. Pour cela nous utiliserons 8 ou 16 mâles (vasectomisés) et 10 femelles receveuses (transfert d'embryons). La totalité des souriceaux nés sera génotypée ; une caractérisation de la fonctionnalité du pancréas des nouveau-nés sera réalisée par des tests métaboliques classiques qui seront suivis de l'euthanasie des animaux (4 à 6 naissances d'intérêt attendues et 8 à 12 animaux contrôles) et d'une étude immunohistochimique afin de valider la structure et la fonction de l'organe. Au total notre projet requiert au maximum l'utilisation de 46 animaux.

Le suivi des animaux sera réalisé selon les règles en vigueur de la directive 2010/63 (surveillance quotidienne, soin et suivi, compétence et responsabilité du personnel, prise en charge de la douleur...). Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R sont les suivantes :

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation. Nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats. Si tout le projet est réalisé en 1 an, nous n'aurons pas besoin de recréer 8 mâles vasectomisés pour la seconde année.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos animaux avec un suivi quotidien des animaux. Les chirurgies sont pratiquées après anesthésie générale avec un mélange contenant un anesthésique et un analgésique. Nous appliquons un onguent ophtalmique dès l'endormissement de pour éviter le dessèchement des yeux l'animal et celui-ci est placé sur un tapis chauffant au cours de la chirurgie et jusqu'à son réveil. Des croquettes de nourriture préalablement humidifiées sont placées dans la cage de façon à ce que l'animal y ait accès sans difficulté dès son réveil.

- « Remplacer » les modèles animaux : nous avons choisi la souris de par l'intérêt des modèles transgéniques disponibles. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

11011 Le botulisme animal, notamment le botulisme aviaire est une pathologie ré-émergente au niveau mondial depuis une dizaine d'années. Cette pathologie est encore méconnue et de ce fait délicate à gérer. Disposer d'un modèle infectieux de botulisme aviaire permettrait d'une part, d'améliorer les connaissances sur la dynamique d'infection du botulisme mais également, de disposer d'un outil efficace pour tester des moyens de lutte pour prévenir ou traiter la maladie et des moyens de gestion des épisodes.

Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la reproduction expérimentale du botulisme aviaire (4 études dont 3 publiées dans les années 70). Sur la base de ces études, une équipe a récemment essayé, sans succès, de reproduire la pathologie en conditions expérimentales. Le botulisme aviaire est dû à la production *in situ* de la toxine botulique par *Clostridium botulinum* puis à la ré-ingestion de la toxine par l'animal via coprophagie. L'identification des conditions optimales d'implantation de *Clostridium botulinum* au niveau de l'appareil digestif des volailles est donc un prérequis au développement d'un modèle de botulisme aviaire. L'objectif étant dans un premier temps d'obtenir la colonisation des animaux - et non d'obtenir des symptômes

de botulisme – il est possible d'utiliser des souches de *C. botulinum* non toxiques ; afin de ne pas induire de signes cliniques chez les individus.

Un premier essai a été réalisé en 2018 et a montré que la co-infection d'une souche non-toxique de *C. botulinum* avec une souche de coccidie permettait d'obtenir une colonisation dans 9 poulets sur 10 avec une inoculation par voie orale.

Le projet a pour objectif de confirmer ce premier résultat pour vérifier sa reproductibilité et de déterminer plus finement les conditions expérimentales permettant l'implantation de *C. botulinum* chez le poulet.

L'utilisation d'un modèle animal pour ce projet est nécessaire et ne peut être remplacée par des expériences *in vitro* car il n'est pas possible de déterminer les conditions optimales d'implantation de *C. botulinum* chez le poulet en conditions *in vitro*. Cependant, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum. Les tests statistiques basés sur les 4 études actuellement disponibles montrent que des lots de 10 animaux sont suffisants pour obtenir les résultats attendus : 160 poulets seront utilisés pour notre projet. Le suivi de l'implantation de *C. botulinum* se fera via des écouvillons cloacaux (méthode non invasive), l'analyse des fientes et, après mise à mort des animaux, via l'analyse des organes en fin d'expérimentation.

Afin de garantir le bien-être des animaux, le milieu sera enrichi notamment avec des cordelettes suspendues dans les cages qui permettent de stimuler l'activité des poulets. Des points limites ont été définis : absence de réaction après sollicitation sonore ou visuelle, impossibilité de s'abreuver ou de s'alimenter.

11012 Le but de ce projet est de valider *in vivo* une découverte récente qui a montré que le flux sanguin est important pour une étape clé de la formation de métastases, l'extravasation, c'est-à-dire la sortie des cellules tumorales du vaisseau sanguin vers un tissu adjacent. Pour cela différentes lignées cellulaires cancéreuses luminescentes ou fluorescentes seront injectées chez la souris, souris qui seront traitées par des drogues dont nous pensons qu'elles inhibent cette étape du processus cancéreux. L'efficacité du traitement sera évaluée par l'impact sur la formation de métastases en utilisant notamment un système d'imagerie dédié au petit animal.

Remplacer : Le modèle animal est nécessaire car il n'existe pas de modèle pour reproduire *in vitro* la cascade d'événements qui sont analysés ici. Nous allons utiliser 3 lignées cancéreuses mammaires différentes, 2 traitements différents et pour chaque traitement un groupe contrôle et un traité, 2 modes d'injections des cellules cancéreuses suivant le tropisme que l'on souhaite, une analyse à 6 jours (extravasation) ou à 21 jours (macro-métastases), avec 8 souris/groupe. Les expériences seront répétées de manière indépendante soit au total 768 souris qui seront utilisées dans ce projet.

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisant pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente en tenant compte de la puissance du test statistique utilisé (sont prévus 2 séries indépendantes de 8 souris/groupe). De plus ce projet utilise un système d'imagerie du petit animal qui permet un suivi longitudinal d'un même animal donc une réduction du nombre total nécessaire. L'injection des cellules cancéreuses se fait sous anesthésie et le reste du protocole expérimental prend en compte l'impact sur la souffrance animale (notamment l'apparition de métastases cérébrales, hépatiques et pulmonaires) et différents critères ont été établis pour justifier un arrêt de l'expérience en cours. Une étude exhaustive des données récentes de la littérature n'a pas permis d'identifier une équipe réalisant des expériences similaires.

Raffiner : Le protocole expérimental prend en compte l'impact sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour éviter toute souffrance animale. Les souris sont maintenues en groupe de 5 par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels et de balancelle en plastique rouge pour favoriser l'activité des souris. Les souris ont accès *ad libitum* à une nourriture de type normal et à de l'eau filtrée. Si une souris présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs (réduction de la réactivité, difficulté de locomotion, fourrure non entretenue, tendance à l'isolement) un traitement par un analgésique sera effectué jusqu'à disparition des symptômes.

11013 Parmi les maladies métaboliques, le diabète de type II est un trouble métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique résultant de défauts dans la sécrétion d'insuline. L'insuline a un rôle essentiel dans le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. La résistance à l'insuline et l'obésité sont principalement responsables du diabète de type II. Actuellement aucune stratégie n'existe pour prévenir ou guérir le diabète de type 2. La Fédération de Diabète Internationale a évalué à 382 millions le nombre de patients diabétiques en 2013 (la majorité entre 40 et 59 ans). Cependant, des découvertes récentes laissent à penser que le dysfonctionnement de certaines cellules pancréatiques est au cœur du mécanisme pathogénique du diabète de type 2. Une meilleure connaissance pourrait permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques anti-obésité et anti-diabète.

Ne pouvant étudier les conséquences d'un régime riche en graisse et en sucre dans un système de culture cellulaire, les modèles animaux rongeurs sont un outil de référence pour l'étude des mécanismes impliqués dans l'obésité et le diabète de type 2 par leur facile prise de poids lorsqu'ils sont soumis à un régime riche en calories.

Dans cette étude, 120 souris seront soumises à un régime riche en graisses et sucres pour devenir obèses et développer un diabète de type 2 afin d'être utilisées dans le projet et 20 souris seront nourries avec un régime standard pour être utilisées comme contrôles. L'ensemble des animaux qui seront utilisés pour la mise en œuvre de ce projet a été évalué à 140 sur 5 ans.

Le recours aux modèles animaux est indispensable pour étudier les mécanismes physiologiques du diabète de type 2 et ses mécanismes pathologiques chez l'adulte. La règle des 3R est appliquée ici pour les principes de réduction et de raffinement. Nous réalisons le protocole alimentaire à la demande de notre client. Le nombre d'animaux est calculé selon son protocole expérimental, soit 140 sur 5 ans. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement. Les points limites sont observés tout au long du projet. Une surveillance des animaux est réalisée quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur. Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la structure du bien-être animal.

11014 La laparoscopie (ou coelioscopie) a révolutionné la chirurgie moderne en offrant une approche mini-invasive de la chirurgie, grâce à l'utilisation de multiples petites incisions par lesquelles sont introduits une caméra et des instruments. Elle s'oppose à la laparotomie, qui consiste à réaliser une seule incision de plusieurs dizaines de centimètres permettant un accès complet à la cavité abdominale, mais dont les suites post-opératoires sont plus douloureuses avec un risque de complications plus élevé. La laparoscopie est devenue la référence pour de nombreuses interventions. Ses avantages, sont nombreux : réduction des saignements peropératoires, des complications postopératoires et de la durée moyenne d'hospitalisation. En revanche, elle est pour le chirurgien à l'origine d'une augmentation de la charge de travail mental, physique, du stress et du temps opératoire. De plus, la vision restreinte est à l'origine de zones aveugles dans la cavité péritonéale. Il peut ainsi se produire des collisions entre les instruments et certains organes responsables de lésions potentiellement graves. Par ailleurs, l'opérateur perd le contrôle visuel des instruments manipulés par son aide. Cette vision réduite entraîne de plus une latence dans la détection de tels événements.

Dans un but d'améliorer la qualité chirurgicale et la prise en charge du patient, un trocart de coelioscopie permettant une vision globale de la scène chirurgicale (Global Vision System - GVS), en obtenant un champ de vision plus large qu'avec un endoscope classique a été développé. Ce nouvel outil a d'ores et déjà satisfait aux tests sur banc d'essai, et sur pièces anatomiques humaines. Ces tests ont permis d'améliorer l'ergonomie et de lever les contraintes opérationnelles du prototype.

L'étude sur modèle porcin vise à compléter l'analyse de risque de ce dispositif médical en conditions réelles (tissus souples, circulation), et s'inscrit dans le cadre du plan de tests institué par un organisme spécialiste des aspects réglementaires liés à la mise sur le marché d'un tel dispositif.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, le projet se découpe en deux phases conditionnelles, pour un maximum de 10 porcs. Chacun permettant de collecter plusieurs mesures (temps de détection d'un évènement indésirable peropératoire) rentrant dans l'analyse statistique des données.

Le bien-être des animaux est respecté par une manipulation adaptée de sujets habitués à l'homme, et la réalisation d'une anesthésie profonde dans les règles de l'art durant tout le temps opératoire. Les animaux sont mis à mort sans risque de réveil dès la fin des actes chirurgicaux.

11015 La mémoire de travail est la capacité de retenir des informations à court terme, quelques secondes ou quelques minutes, pour réaliser des opérations cognitives fondées sur ces informations. Bien que les mécanismes neuronaux restent à clarifier, on suppose que ce processus repose sur la persistance de l'activité neuronale, codant l'information à retenir, pendant la période de rétention mnésique. Le système cholinergique est constitué par des neurones de projection qui ont leur corps cellulaire situé dans différents noyaux du prosencéphale basale et qui envoient leurs axones aux structures corticales impliqués dans la mémoire de travail (néocortex, hippocampes et bulbe olfactif). L'activité de décharge de ces neurones change de façon dynamique en fonction de l'état physiologique de l'animale (éveil active, éveillé calme et pendant les différentes phases du sommeil) produisant des variations de la concentration corticale du neurotransmetteur acétylcholine (ACh). Il a été montré que la fonctionnalité correcte du système cholinergique est nécessaire à la mémoire de travail et une partie des déficits mnésiques liés à la maladie d'Alzheimer est attribuée à la dégénérescence de ce système. Cependant le rôle spécifique joué par le système cholinergique, dans la mémoire de travail, reste à clarifier.

La mémoire de travail olfactive, *i.e.* la rétention transitoire des caractéristiques d'une odeur, peut être induite et étudiée dans des modèles animaux. Le modèle animal permet de mesurer les modifications extracellulaires d'ACh produites par l'activité du système cholinergique lors de différentes tâches cognitives/comportementales et aussi de contrôler (activer ou inhiber) expérimentalement l'activité du système cholinergique pendant ces mêmes tâches. Pour cela, le modèle animal constitue une porte d'entrée à l'étude du lien existant entre l'activité du système cholinergique, la libération corticale d'ACh et la mémoire de travail.

L'objectif de ce projet est de déterminer comment l'activité du système cholinergique participe à la mémoire de travail olfactive chez la souris.

Conformité avec la règle de 3R :

Remplacement. L'étude des processus physiologiques et plus particulièrement l'étude des bases neuronales de la mémoire nécessite l'utilisation d'animaux vivants et ne peut s'envisager sur modèles strictement *in vitro*. Notre protocole nécessite l'utilisation d'animaux transgéniques permettant de contrôler l'activité du système cholinergique par stimulation lumineuse grâce à la technique optogénétique. C'est pour cela que la souris a été choisie comme modèle expérimentale.

Réduction. Le nombre d'animaux utilisés dans chaque type d'expérience sera adapté de façon à n'utiliser que l'effectif d'animaux nécessaire à la validation statistique des effets observés. Des expériences pilotes sur des effectifs réduits d'animaux (5) seront effectuées préalablement. Les analyses statistiques des résultats obtenus sur ces lots permettront de définir le nombre total d'animaux nécessaires. Les animaux seront commandés, ou fait reproduire, au fur et à mesure que l'effective totale pour chaque type d'expérience est connue. Ceci permettra de réduire au maximum le nombre d'animaux surnuméraires, qui seront éventuellement replacés dans d'autres procédures menées au laboratoire. Une autorisation pour un nombre maximal de 400 animaux sur une période de 4 ans est demandée ; ceci prend en compte le nombre de groupes expérimentaux envisagés (8) et d'éventuelles pertes dues aux critères d'arrêt de la procédure expérimentale.

Raffinement. Les souris seront hébergées en groupes de 5 animaux dans des cages présentant des éléments d'enrichissement (cachettes, tuyaux, roue d'activité, bois à grignoter...) dans notre animalerie agréée avec boisson *ad libitum*. Concernant les chirurgies et le suivi post-opératoire, le bien-être des animaux avant, pendant et après l'opération sera surveillé. Pendant l'opération nous utiliserons des anesthésiques (Kétamine, Lidocaïne), analgésique (Xylazine) et antalgique

(Kétoprofène) approprié. Ensuite, le poids des animaux sera surveillé deux fois par jour pendant les 15 jours qui suivent l'opération ainsi que l'état général des animaux, prise de nourriture, locomotion, hydratation (nous pourrions réhydrater l'animal si nécessaire). Ce rythme de surveillance pourra être augmenté si l'état de l'animal se dégrade. Des grilles de score des points limites seront utilisées pour évaluer le bien-être animal et la procédure expérimentale sera suspendue si un animal venait à présenter des signes de mal-être.

11016 La transformation maligne est associée à des dérèglements du métabolisme cellulaire. La mitochondrie est au centre de la régulation du métabolisme cellulaire énergétique, et une altération des fonctions mitochondriales joue un rôle dans le développement tumoral. Ainsi, interférer avec le métabolisme cellulaire représente de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les traitements anti-cancéreux. L'objectif est de comprendre les mécanismes moléculaires qui contrôlent la prolifération tumorale des lymphocytes T dans la leucémie aigüe lymphoblastique (LAL-T) et sa récurrence fréquente entraînant le décès chez l'Homme. Cette étude est réalisée sur plusieurs modèles de souris transgéniques développant des leucémies. L'usage exclusif de lignées cellulaires ne permettrait pas d'appréhender la complexité des organes lymphoïdes qui sont composés de plusieurs types cellulaires dont le métabolisme et le stress oxydant peuvent influencer sur la tumorigenèse. Pour ce projet la souris représente un modèle qui permet de générer des leucémies avec une étiologie proche des LAL-T humaines et le modèle murin utilisé dans ce projet est un modèle reproduisant le plus fidèlement le phénotype humain. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera ainsi réduit au minimum permettant une analyse statistique efficace des résultats d'après nos données antérieures. Au total, ce projet se déroulant sur 5 ans nécessite l'étude de 650 souris. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse des animaux, en plus de la visite quotidienne réglementaire les animaux seront suivis sur des points limites spécifiques deux fois par semaine, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. De plus les injections intraveineuses se feront sous anesthésie générale et l'utilisation d'un régime antioxydant permettra de confirmer son effet bénéfique sur la lutte contre la leucémie.

A terme ce projet permettra de mieux caractériser le développement des leucémies LAL-T liés à des dérèglements métaboliques et du stress oxydant. Nous espérons identifier des acteurs moléculaires et des voies de signalisation capables de freiner ou stopper le développement et la récurrence de leucémie.

11017 Le diabète de type 1, ou diabète insulino-dépendant, est une maladie auto-immune multifactorielle. Des études expérimentales chez le rongeur ont identifié l'augmentation de la perméabilité intestinale comme un facteur précoce de la pathologie et une cible thérapeutique qui pourrait en prévenir le déclenchement. De par notre expertise dans l'étude de la perméabilité intestinale, nous nous proposons d'étudier finement la perméabilité intestinale chez des souris diabétiques et témoins et ce par différentes techniques, *in vivo* et *ex vivo* (Chambres de Ussing) et sur différents fragments de l'intestin (intestin grêle et côlon). L'objectif de ce projet de recherche est de mieux caractériser la perméabilité intestinale chez les animaux témoins et diabétiques et ainsi mieux comprendre son rôle dans le déclenchement/entretien de la pathologie et d'identifier des cibles thérapeutiques. Un suivi de la glycémie par prélèvement d'une goutte de sang à la queue sera réalisé pour évaluer le niveau du diabète.

Ce projet de recherche qui a pour but de caractériser la perméabilité intestinale dans une pathologie complexe, nécessite donc de travailler sur l'animal, aucun substitut *in vitro* n'est envisageable. Toutefois, l'utilisation d'outils statistiques va nous permettre de minimiser le nombre d'animaux à utiliser, tout en permettant d'obtenir des résultats robustes et concluants. Ainsi, 240 souris seront nécessaires pendant la durée de ce projet de recherche. Les souris seront hébergées en cages réglementaires de 4 individus et leur bien-être favorisé par un enrichissement du milieu au moyen de matériaux de nidification tels que du papier absorbant. L'eau et la nourriture seront disponibles à volonté pendant toute la durée de leur séjour. Aucune douleur ou souffrance n'est attendue au regard des petits volumes de sang prélevés (maximum 2 gouttes inférieures à 0.5ml) et des soins apportés aux souris pour leur assurer un état de santé et bien-être optimal.

11018 L'objectif de ces études est de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires des réponses immunitaires mise en jeu par les vaccins. Ces études portent principalement sur les adjuvants vaccinaux et consisteront à définir leur mode d'action. Ces travaux sont importants pour la Santé Publique car les vaccins figurent parmi les plus grands succès de la recherche en biologie appliquée à la Santé.

Les vaccins représentent par ailleurs une source d'inquiétude au sein de la société civile. Ces études ont pour objectifs (1) de mieux comprendre les vaccins existants en particulier appréhender certains effets secondaires au travers du mode d'action des adjuvants et (2) favoriser le développement de nouvelles stratégies vaccinales muqueuses avec des adjuvants plus surs et parfaitement documentés quant à leur fonctionnement sur le système immunitaire. Ce deuxième objectif ambitionne de développer des vaccins contre les infections respiratoires bactériennes ou virales qui représentent une menace perpétuelle pour la Santé Publique en particulier dans des populations sensibles tels que les nouveau-nés, les jeunes enfants ou les personnes âgées.

Il est évident que la complexité des interactions des vaccins avec le système immunitaire de l'animal ne peut être reproduite uniquement dans des tests *in vitro*. Pour ces raisons, nos investigations nécessitent des tests chez l'animal, plus particulièrement la souris et certaines de ses déclinaisons immunodéficientes. Il est notable que la réponse aux vaccins et adjuvants étudiés au laboratoire repose sur la réponse immunitaire innée qui est universelle et très conservée entre les mammifères, en particulier la souris et l'homme.

Nos études répondront à la règle des 3 « R » : Réduire, Remplacer et Raffiner à l'aide de systèmes modèles *in vitro* autant que cela est possible pour caractériser les vaccins et adjuvants. Toutes les approches permettant une analyse multiparamétrique seront mises en œuvre pour obtenir le maximum de données exploitables par animal et ainsi de limiter le nombre utilisé. Les modèles *in vitro* de tests des vaccins et adjuvants seront par ailleurs privilégiés comme alternatives à l'expérimentation animale.

Les expériences seront généralement composées de 3 groupes de souris vaccinées (antigène seul, antigène + candidat adjuvant, et antigène + adjuvant de référence). Pour les expériences d'efficacité de la vaccination, 10 souris par groupes seront nécessaires alors que 5 souris par groupe seront utilisées pour les analyses multiparamétriques visant à disséquer les mécanismes de mise en place de l'immunité adaptative pour un total de 2400 souris.

La vaccination ne provoque pas d'altération générale chez l'animal (procédure de classe légère). Les doses, les voies d'administration et les fréquences de vaccination utilisées n'induisent pas de douleur modérée ou sévère. Les vaccinations chez l'animal participent surtout à modéliser de futures interventions vaccinales qui pourraient être réalisés chez l'homme.

11019 La prématurité est la principale cause de décès et de handicaps chez les nouveau-nés. Dans les pays industrialisés, en raison de l'amélioration des soins intensifs néonataux, le nombre des nourrissons de très faible poids de naissance qui survivent au-delà de l'enfance est en hausse. Cependant, le cerveau de ces prématurés reste extrêmement vulnérable. Les lésions diffuses de la substance blanche (LSB) constituent la principale forme de lésion cérébrale du prématuré. L'inflammation périnatale que subit une grande majorité des enfants prématurés et la grande vulnérabilité des cellules cérébrales en développement à ce stress inflammatoire est à l'origine de l'apparition de la plupart de ces lésions. Elles induisent des handicaps moteurs, des déficits cognitifs et des troubles comportementaux qui persistent à l'âge adulte. Malheureusement, aucune thérapie spécifique de ces lésions diffuses n'existe à ce jour. L'amélioration du pronostic de cette pathologie repose donc sur la découverte de nouvelles stratégies neuroprotectrices. Les objectifs de ce projet visent donc (1) à comprendre les mécanismes impliqués dans l'apparition des LSB et (2) à évaluer l'efficacité de différentes stratégies neuroprotectrices sur les déficits comportementaux. Pour cela, nous utiliserons un modèle de LSB induites par des injections d'interleukine 1 beta chez le souriceau qui reproduit la pathologie humaine de l'enfant prématuré. Ces animaux auront été traités par 3 molécules potentiellement bénéfiques. Dans ce modèle largement utilisé, il sera étudié les déficits comportementaux au stade adulte. A l'issue des tests comportementaux, les souris seront euthanasiées pour prélèvement du cerveau afin d'étudier les LSB. Le nombre de souris utilisées

sera de 180. La bonne reproductibilité et le faible taux de mortalité (5%) de ce modèle expérimental permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. La mise en place de points limites ainsi que l'observation régulière du comportement des animaux permettront d'identifier et de limiter toute souffrance et douleur. Une partie des travaux de ce projet a déjà été réalisée *in vitro* sur des cultures cellulaires. Cependant, les mécanismes impliqués dans les LSB mettent en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires au cours du développement cérébral qu'il est impossible de reproduire *in vitro*. A terme, les résultats de ce projet permettront d'évaluer l'efficacité de stratégie thérapeutique pour le traitement des LSB et des déficits comportementaux consécutifs à une inflammation néonatale. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments afin de limiter les conséquences d'une inflammation chez les bébés.

11020 La biologie synthétique invente une nouvelle médecine : une forme de thérapie génique améliorée. Des cellules aux gènes modifiés sont créées. Implantées dans le corps, elles détectent, soignent les maladies, tel un « robot urgentiste ». Les cellules étudiées ici intègrent des circuits génétiques traitant des pathologies comme le diabète, l'obésité, le psoriasis, la goutte, la maladie de Parkinson. Ces circuits produisent la molécule thérapeutique après activation par des inducteurs externes : administration orale de caféine, menthe, exposition à la lumière bleue, application cutanée d'une pommade mentholée. La toxicité et la fonctionnalité de ces cellules modifiées sont testées et validées au préalable sur culture cellulaire (Réduire, Remplacer). Il est ensuite nécessaire d'avoir recours à la souris pour l'étude *in vivo*. Pour les 2 procédures suivantes, les cellules modifiées seront confinées dans des capsules avant injection chez la souris avec une crème loco-anesthésiante (Raffiner).

En 1ère procédure, un test de toxicité sera réalisé sur 2 souris pour chaque nouvel inducteur ou cellule encapsulée testés. La 2ème procédure permettra de définir, régler, valider la fonctionnalité de ces cellules modifiées *in vivo*. La 3ème procédure, à visée humaine, testera les cellules validées précédemment, confinées dans un implant biocompatible mis en sous-cutané chez la souris anesthésiée. Ceci augmente le nombre de cellules implantées, prolonge leur durée de vie, réduit le nombre d'animaux, (Réduire et Raffiner).

Pour chaque procédure :

-un prélèvement sanguin sera fait sous anesthésie gazeuse 2 jours et 2 semaines après l'injection des capsules ou la pose de l'implant afin de doser les molécules d'intérêt.

-le protocole type utilisera 32 souris (4 lots de 8) avec 6 protocoles par an.

Un nombre total maximum de 1920 souris pourra être utilisé sur 5 ans. Ce nombre calculé au plus juste pour interpréter statistiquement les résultats, sera revu à la baisse dès l'obtention des résultats escomptés. Les groupes témoins négatifs non mutualisables, seront réutilisés en partie pour le test de toxicité et en TP de physio-pharmacologie après consultation de la SBEA et du vétérinaire référent, (Réduire). Les procédures sont sans dommages majeurs pour l'animal, et des points limites adaptés seront définis pour les procédures n°1 et 3 (Raffiner).

11021 Les ganglions de la base sont un ensemble de structures cérébrales impliquées dans le contrôle moteur et l'apprentissage des habitudes. L'importance des ganglions de la base est soulignée par la gravité des pathologies qui résultent de leur dysfonctionnement : maladie de Parkinson, de Huntington, addictions, troubles obsessionnels compulsifs. Le striatum est une structure des ganglions de la base, qui constitue la principale voie d'entrée : il reçoit des informations du cortex cérébral et du thalamus, qu'il filtre pour extraire les informations pertinentes du "bruit de fond". Le fonctionnement du striatum est modulé par les circuits locaux. En effet, le striatum est composé de plusieurs sous-populations neuronales, en particulier des interneurons libérant différents neurotransmetteurs, comme le GABA ou l'acétylcholine. Le striatum est modulé également par les entrées d'autres structures, et en particulier la dopamine issue des neurones de la substance noire compacte (dont la dégénérescence est à l'origine de la maladie de Parkinson).

Notre projet a un objectif scientifique : comprendre le rôle des modulations par le GABA, l'acétylcholine et la dopamine dans le traitement des informations parvenant au striatum, dans le contrôle moteur et l'apprentissage des habitudes. Ce projet se base sur nos résultats obtenus *ex vivo*, pour tester les hypothèses issues de ces résultats dans le réseau intact des ganglions de la base. Pour cela, nous utilisons des souris transgéniques qui permettent d'activer, d'inhiber ou d'identifier différentes sous-populations de neurones grâce à la lumière (en ciblant spécifiquement ceux qui libèrent le GABA, l'acétylcholine ou la dopamine). Nous implantons une électrode dans le striatum, ce qui permet d'enregistrer l'activité neuronale, et une fibre optique, qui permet l'identification, l'activation ou l'inhibition des neurones ciblés. Nous observons ensuite l'activité neuronale, et les effets de la modulation par la lumière dans des tests comportementaux non douloureux. Les modifications génétiques dans ces lignées ne perturbent pas la physiologie des animaux, et sont complètement "silencieuses" en dehors des expériences (phénotype "non-dommageable"). Elles servent uniquement d'outil pour identifier, activer ou inhiber les neurones ciblés. De plus, nous ne travaillons pas sur des structures impliquées dans la douleur ou la peur, donc activer ou inhiber des neurones dans ces structures ne cause pas de souffrance à l'animal. Nos résultats permettront de mieux comprendre l'intégration des informations dans le striatum pour éventuellement dévoiler de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter les pathologies.

Il n'existe pas de modèle mathématique ni *in vitro* décrivant les dynamiques des réseaux neuronaux des ganglions de la base dans leur complexité, d'où la nécessité d'avoir recours à des animaux vivants. Il est nécessaire d'utiliser un modèle animal mammifère pour obtenir des résultats potentiellement transposables à l'Homme, car les structures des ganglions de la base ne sont pas présentes, ou sont organisées différemment chez les autres vertébrés (et absentes chez les invertébrés). Parmi les modèles animaux mammifères, les souris sont les plus classiquement utilisées, permettant notamment l'accès aux nombreuses lignées transgéniques indispensables pour notre projet. L'implantation "à demeure" d'électrodes permet d'utiliser une même souris sur plusieurs semaines. De plus, nous utilisons des électrodes pourvues de 32 ou 64 sites d'enregistrement, ce qui permet d'augmenter la quantité de données obtenues par animal, et donc de diminuer le nombre d'animaux. D'autre part, lorsque c'est possible, plusieurs tests comportementaux sont appliqués aux mêmes lots de souris, permettant de réduire là encore le nombre total d'animaux utilisés. Une analyse statistique appropriée est utilisée pour assurer un nombre suffisant d'animaux par groupe pour obtenir un résultat conclusif. D'après les données de la littérature et les standards actuels, nous estimons utiliser au maximum 500 animaux (100 animaux par an). Les procédures expérimentales sont raffinées à chaque étape : les animaux sont hébergés et élevés en condition de milieu enrichi (avec du matériel pour faire un nid) dans une animalerie agréée. La douleur est minimisée lors de la chirurgie (utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques appropriés). Les implants ont été développés afin de réduire leur poids au minimum et sont bien supportés par les animaux (et acceptés au niveau international). Le bien-être des animaux est surveillé quotidiennement. Les tests comportementaux impliquent des récompenses mais pas de stimuli aversifs ni douloureux.

11022 Avec une incidence de 2400 nouveaux cas par an en France, les tumeurs cérébrales les plus agressives (glioblastome) sont la 3ème cause de décès par cancer chez l'adulte. Le traitement de référence consiste, lorsque cela est possible, à retirer chirurgicalement la tumeur, puis à traiter par radiothérapie et chimiothérapie. Cependant dans certains cas, ces tumeurs ne sont ni opérables, ni contrôlables par les thérapies classiques. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Dans ce contexte, la thérapie photodynamique (PDT) s'inscrit comme une stratégie complémentaire prometteuse pour améliorer l'éradication tumorale. La PDT est un traitement qui utilise des médicaments non toxiques à l'obscurité (appelés agents photosensibilisants ou photosensibilisateurs) en combinaison avec la lumière (apportée par une fibre optique) et l'oxygène pour tuer les cellules cancéreuses.

La finalité clinique de notre recherche est de proposer une nouvelle thérapie non invasive pour le traitement des glioblastomes : la thérapie photodynamique interstitielle (fibre optique insérée au

sein de la zone tumorale) anti- vasculaire (ciblage et destruction des vaisseaux sanguins de la tumeur).

Des nanoparticules utilisées en clinique (Phase I) pour l'imagerie (agent de contraste pour l'IRM) et le traitement des tumeurs cérébrales ont été fonctionnalisées avec un photosensibilisateur (pour réaliser le traitement PDT) et une molécule ciblant les vaisseaux sanguins de la tumeur afin de favoriser l'effet anti-vasculaire du traitement par thérapie photodynamique.

Une précédente étude nous a permis de valider chez l'animal la faisabilité du concept de la thérapie photodynamique interstitielle et d'optimiser les conditions de traitement. Des études *in vitro* (REPLACEMENT) ont permis de valider la stratégie de ciblage du réseau vasculaire de la tumeur ainsi que la potentialisation de l'effet vasculaire de la thérapie photodynamique.

Nous devons maintenant confirmer ces résultats *in vivo*. Le REMPLACEMENT des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible dans notre contexte : l'efficacité des thérapies anticancéreuses dépend, chez l'animal comme chez l'Homme, de phénomènes complexes (inhérents à la physiopathologie cancéreuse d'une part, et, au comportement des nanoparticules en milieu biologique d'autre part) qui ne peuvent pas être appréhendés dans leur globalité sur des modèles cellulaires *in vitro*.

Dans ce cadre, l'étude préclinique sera réalisée sur 72 rats porteurs d'une tumeur intracérébrale. Des méthodes non-invasives d'imagerie par IRM et microscopie intravitale seront utilisées permettant de réaliser différents types d'exams, et de les réitérer dans le temps sur un même animal (REDUCTION). Le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les rats seront anesthésiés dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur, imagerie, traitement), et mis à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (RAFFINEMENT) : apparition d'altérations fonctionnelles, perte de poids de plus de 20% par rapport au poids avant greffes s'étalant sur plus de trois jours consécutifs, altération de l'aspect général de l'animal ou de son comportement, tumeur supérieur à 5 mm de diamètre.

11023 La fibrose hépatique est la conséquence de mécanismes, de réparation tissulaire et de réactions inflammatoires, chroniques et non résolus. Elle est caractérisée par une augmentation du dépôt de protéines matricielles qui désorganisent l'architecture des organes touchés. La fibrose hépatique est une résultante commune aux pathologies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine virale (hépatite C), parasitaire, biliaire, auto-immune ou consécutive à une stéatohépatite alcoolique ou non alcoolique (NASH). Cette affection est associée à une évolution pathologique grave puisqu'au stade tardif de la maladie, une cirrhose hépatique et ses complications potentielles, insuffisance hépatique et hépatocarcinome (HCC) peuvent survenir.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la NASH. L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité thérapeutique de molécules dans la prévention et le traitement de la NASH et de la fibrose.

De nombreux modèles utilisant des rongeurs ont été décrits dans la littérature pour l'étude de ces pathologies. Aucun de ces modèles ne reproduit parfaitement la physiopathologie humaine de la NASH. Aussi, nous avons développé un modèle innovant que nous souhaitons caractériser et sur lequel nous évaluerons les capacités thérapeutiques de nos molécules.

Une première évaluation des molécules sera réalisée sur des modèles *in vitro*, seules celles ayant prouvé un potentiel thérapeutique feront alors l'objet d'une évaluation chez l'animal. Ainsi, nous pourrions étudier la réelle efficacité des composés dans un système biologique complexe, tout en respectant la règle des 3 R. Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. En s'appuyant sur notre expérience, il s'avère que le délai de mise en place de la pathologie, choisi dans cette procédure, n'entraîne pas de douleur chez l'animal. Toutefois, les animaux seront sous

observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant. Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être.

L'évaluation de molécules d'intérêt pour le traitement de la fibrose hépatique sera réalisée au cours de la durée de 5 ans couverte par ce projet avec 9280 animaux (rats ou souris)

11024 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, c'est à dire l'occlusion d'un vaisseau cérébral par un caillot sanguin, est la 3ème cause de mortalité et la 1ère cause de morbidité des pays industrialisés : 120000 personnes en sont victimes chaque année en France. Le rtPA ou activateur tissulaire du plasminogène, seul traitement disponible permettant de détruire le caillot sanguin ne peut être administré que lors des 4.5 premières heures de survenue de l'AVC, ce qui limite considérablement son utilisation. Or, les lésions de l'AVC se poursuivent au-delà de la phase aiguë en raison de l'activation de cellules inflammatoires présentes dans le cerveau (microglie) ou bien provenant du sang (monocytes/macrophages). Deux types de réponses ont ainsi été identifiés, l'une neurotoxique pro-inflammatoire (M1) et l'autre neuroprotectrice anti-inflammatoire (M2). L'expression de l'hepcidine, hormone peptidique sécrétée par les monocytes en contexte inflammatoire, est augmentée dans l'infarctus du myocarde ou l'AVC expérimental. *In vitro*, l'hepcidine, diminue la production de cytokines pro-inflammatoires, favorisant ainsi la polarisation M1/M2 vers le versant anti-inflammatoire. Ces données placent donc l'hepcidine à l'intersection entre ischémie et immunité. Comprendre quels sont les régulateurs de cette réponse inflammatoire est indispensable pour proposer de nouvelles cibles thérapeutiques au-delà de la phase aiguë.

Notre projet repose sur des modèles murins wild-type (WT) (dont le gène codant pour l'hepcidine n'est pas modifié) transplantés avec la moelle osseuse d'animaux dont le gène codant pour l'hepcidine aura été invalidé (souris hepcidine knock-out ou KO). Ces animaux seront soumis à une ischémie cérébrale expérimentale. Les objectifs du projet sont 1) d'étudier l'effet de l'hepcidine, en termes de réduction du volume de l'infarctus cérébral, d'augmentation de la survie neuronale, de la neurogenèse et d'amélioration du déficit neurologique et 2) d'analyser la régulation de la réponse inflammatoire post-ischémique.

Les différents axes du projet impliquent 236 souris pour une période de 4 ans. Deux groupes de souris soumises à une ischémie expérimentale seront comparés : des souris dont la moelle osseuse est reconstituée avec la moelle de souris WT et des souris dont la moelle osseuse est reconstituée avec de la moelle de souris hepcidine KO (n=6-8 par groupe, calculé pour obtenir la puissance statistique nécessaire). Le traitement du cerveau incompatible entre certaines procédures (histologie, biologie moléculaire et cytométrie de flux) implique 3 séries en parallèle. Ces analyses seront réalisées à 5 temps. Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Un soin particulier sera apporté au traitement contre la douleur avant et après les procédures chirurgicales et l'animal sera surveillé jusqu'à la fin de l'étude. Une analgésie par buprénorphine (0.1mg/kg en sous-cutané) sera réalisée 30 minutes avant le début de la chirurgie et renouvelée /12h pendant 48h. La souris est surveillée en couveuse puis remise en cage (5 souris par cage). Au cas où les douleurs persisteraient malgré les procédures entreprises, l'animal sera mis à mort.

Aucune approche *in vitro* ne permet de rendre compte de la complexité des interactions entre les organes lymphoïdes et le cerveau après ischémie cérébrale au cours du temps.

11025 Des progrès considérables ont été accomplis dans l'identification de nouvelles maladies correspondant à des altérations de gènes intervenant dans la reproduction. Chez une patiente présentant une pilosité abondante et anormale accompagnée d'une infertilité, nous avons récemment identifié une mutation très rare d'une molécule qui a une fonction cruciale dans l'ovaire. Nous avons montré par des études *in vitro* que la fonction de cette protéine mutée est altérée. Nous devons maintenant démontrer que cette mutation est directement responsable de la pathologie observée chez cette patiente.

Cette maladie est complexe et seule l'expérimentation animale mimant le plus fidèlement possible la mutation permettra de trouver des solutions thérapeutiques.

La preuve ultime est donc d'introduire cette mutation dans une souris pour voir si celle-ci développe la même pathologie. Nous allons donc créer un modèle de souris et nous évaluerons l'apparition de la puberté chez les animaux mutés en examinant quotidiennement l'ouverture vaginale après la naissance. Nous regarderons ensuite si les cycles des femelles pubères sont modifiés par des techniques classiques de frottis. Nous réaliserons des prélèvements sanguins à différents temps sur une période d'environ 25 semaines, pour évaluer le niveau des différentes hormones de la reproduction des souris femelles. Les volumes de prélèvement et les temps de récupération entre les prélèvements seront respectés. La capacité des femelles à se reproduire sera entreprise et analysée. En cas d'infertilité, les souris recevront une administration exogène d'hormones régulant la reproduction pour voir si la souris peut être rendue fertile. La patiente, en dehors de ce problème de fertilité, présente également d'autres anomalies. Nous évaluerons donc un certain nombre de paramètres : suivi du poids corporel au cours du temps, test de vérification d'apparition du diabète. Une analyse des coupes d'ovaires par microscopie sera réalisée pour évaluer les défauts et les perturbations induits par la mutation. Le nombre de souris utilisées pour cette étude sera de 182 animaux. Afin de suivre la règle des 3R, et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques, nous limiterons le nombre d'expériences et de souris nécessaires. La mutation introduite dans ce modèle de souris ne devrait pas générer de souffrance mais nous avons tout de même établi des points limites qui entraînent la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Le remplacement n'est pas possible. Nous avons réalisé une étude *in vitro* pour montrer l'effet délétère de la mutation mais la seule façon de prouver que cette mutation est responsable de la pathologie observée chez la patiente est de développer un modèle animal avec la même mutation pour voir si on reproduit la maladie. Ce travail permettra de valider de façon définitive l'implication de la mutation que nous avons identifiée chez cette patiente et permettra de la traiter et de la suivre efficacement.

11026 L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques associés aux apprentissages sensorimoteurs. Nous souhaitons en particulier déterminer dans quelle mesure l'apprentissage moteur se produit d'un essai à un autre. L'apprentissage par renforcement est une des principales stratégies pour entraîner des animaux, humains compris. Cette forme d'apprentissage, reposant sur le principe de l'essai/erreur, implique qu'un signal ('renforçateur') est fourni à un sujet lorsqu'il effectue une action, ce signal pouvant être donné lorsque le sujet réussit ou échoue pour l'action correspondante. Bien que des concepts théoriques aient permis d'associer variabilité motrice et récompense aux performances d'apprentissage, comment le cerveau utilise l'information d'essais moteurs individuels réussis ou échoués reste indéterminé. Est-ce que les mécanismes neurobiologiques impliqués dans l'apprentissage sont plus associés à des essais moteurs réussis (par exemple en les mémorisant ou en apprenant à les répéter) ou plus à des essais moteurs échoués (par exemple en essayant de produire l'opposé) ? Etablir comment le cerveau utilise des essais individuels pour améliorer des actions motrices apporterait de nombreux avantages : cela permettrait d'améliorer les stratégies d'entraînement pour des animaux, y compris des humains, et cela pourrait aussi conduire au développement d'algorithmes d'apprentissage performants.

Les oiseaux chanteurs possèdent un réseau de structures cérébrales impliquées dans l'apprentissage, la perception et la production du chant. Ils sont actuellement considérés comme un modèle animal d'étude des bases neurales du langage ; leurs vocalisations présentant des points communs avec la parole humaine. Comme les humains, ils apprennent à produire des séries de signaux acoustiques ayant une structure acoustique et une organisation syntaxique.

Nous nous proposons d'étudier quelle stratégie le cerveau met-il en place lors des apprentissages par essai-erreur : est-il plus performant d'apprendre des essais où le sujet réussit une tâche comportementale ou lorsqu'il échoue ? L'approche que nous adopterons reposera sur l'utilisation de stimulations électriques chroniques visant à guider l'oiseau lors de la phase d'apprentissage. Les oiseaux seront impliqués dans une procédure au cours de laquelle ils devront adapter leur chant en fonction d'un renforçateur, ce dernier correspondant à l'exposition à un bruit blanc (couvrant

l'ensemble des fréquences) pendant une courte période de temps. En stimulant électriquement une structure cérébrale d'intérêt de façon contingente ou non à l'exposition au renforçateur, nous serons en mesure de déterminer si les oiseaux parviennent à adapter leur chant en fonction de leur succès ou de leurs erreurs. Cette étude pourra fournir des informations quant à l'utilisation de cette méthode de stimulations électriques profondes (déjà appliquée chez l'humain dans le cadre de pathologie parkinsonienne) pour pallier d'éventuels troubles du langage ou de l'apprentissage sensorimoteur.

Nos expérimentations impliqueront un maximum de 100 oiseaux répartis dans 7 groupes d'étude différents. Le choix du modèle animal est lié au fait que, chez peu d'espèces animales, les individus sont capables d'apprendre à moduler leur production vocale. Parmi les espèces qui montrent de telles capacités figurent les oiseaux chanteurs. Des études comportementales ont, en effet, montré que le diamant mandarin peut modifier les caractéristiques spectrales et temporelles de son chant pendant une tâche d'apprentissage.

Au cours de ces dernières années, des études neuro-anatomiques se sont intéressées au cerveau des diamants mandarins, un atlas stéréotaxique présentant de façon précise la localisation, par rapport à un point de repère, des différentes régions cérébrales impliquées dans le comportement de chant a été mis au point, ce qui nous permet de cibler nos études sur ces régions et ainsi de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les expérimentations seront conduites sur un petit nombre d'oiseaux à la fois, ce qui permettra d'adapter le protocole expérimental au fur et à mesure et de ne collecter que le nombre de données nécessaires pour obtenir suffisamment de puissance statistique pour les résultats. L'étude du contrôle vocal des oiseaux nécessite qu'ils soient dans les meilleures conditions. Les oiseaux seront contrôlés au quotidien afin d'évaluer les niveaux potentiels de douleur et de souffrance. Un antalgique sera administré lors des anesthésies générales et tant que des signes extérieurs de douleur seront observés.

11027 La dépression et l'anxiété constituent un groupe relativement homogène d'affections psychiatriques d'une gravité certaine et dont l'importance sociétale réside dans leur prévalence mondiale qui se situe entre 10 et 25% et qui pourrait même concerner jusqu'à 30% des sujets âgés. En France, un constat annuel établit que 5% des hommes et 10% des femmes présentent cette affection ; elle est d'environ 15% pour les hommes et de 25% pour les femmes sur toute la vie (rapport OMS). Alors que les antidépresseurs sont utilisés en thérapeutique depuis plus de 50 ans, la physiopathologie des troubles de l'humeur est encore mal élucidée, ce qui explique vraisemblablement qu'on assiste à une stagnation des avancées thérapeutiques. Cette stagnation est spécialement déplorée en matière de délai d'action qui pour les différents traitements apparaît trop long (environ 15 jours minimum), ainsi qu'en matière de résistance aux thérapeutiques actuelles (2/3 de répondeurs, soit 1/3 d'échecs quel que soit le traitement), et du fait que nombre de ces médicaments développent des effets indésirables importants (affectant l'éveil, l'attention, la cognition, l'appétit, l'activité sexuelle, ou encore induisent des symptômes de sevrage après l'arrêt des traitements...). Pour tenter de s'affranchir de l'ensemble des inconvénients associés aux traitements de ces troubles psychiques, la recherche de nouvelles stratégies et molécules thérapeutiques, assise sur une meilleure compréhension de leur physiologie, pouvant conduire à des médicaments innovants, agissant rapidement, y compris chez les patients résistants aux traitements actuels, constitue un enjeu majeur pour la recherche biomédicale.

La recherche, en matière de thérapie des troubles psychiques, s'est surtout focalisée sur les transmissions monoaminergiques et GABAergiques. Cependant, d'autres acteurs neuroactifs tels que les facteurs neurotrophiques comme le BDNF, les hormones (comme la corticostérone et certains métaux alcalins comme le lithium) et aussi des neuropeptides et certaines enzymes sont apparus comme jouant aussi des rôles dans les troubles psychiques.

Dans ce contexte, l'époxyde hydrolase soluble (sEH) est une enzyme bi fonctionnelle située dans les cellules du système cardiovasculaire mais également du système nerveux central. Elle possède une partie hydrolase qui métabolise des dérivés lipidiques vasodilatateurs et anti-inflammatoires, les acides époxyeicosatriénoïques, et qui est la cible d'inhibiteurs pharmacologiques en développement, notamment pour le traitement des maladies cardiométaboliques. De plus, la sEH possède une activité phosphatase pour laquelle il n'existe pas d'inhibiteur spécifique. Le rôle de la

sEH phosphatase reste mal connu notamment au niveau du système nerveux central mais des études évaluant les effets d'un inhibiteur pharmacologique de la sEH hydrolase et ceux obtenus chez des souris 'knock-out' pour la sEH (donc sans activité hydrolase et phosphatase) suggèrent que cette enzyme pourrait jouer un rôle important notamment dans la physiopathologie de la dépression.

Partant de ces constatations, l'objectif du présent projet est de rechercher le rôle de la sEH phosphatase au niveau du système nerveux central. Pour ce faire, un modèle de rat transgénique a été créé par la méthodologie CRISPR-Cas9 consistant en la mutation d'un acide aminé dans le site catalytique de la sEH phosphatase pour l'inactiver tout en conservant la partie hydrolase active (rat 'knock-in' KI sEHphosph) et comparer son comportement à celui des rats sauvages.

Les procédures expérimentales prévues dans ce projet, portant sur des tests d'évaluations psychiques et utilisant des molécules potentiellement antidépressives/anxiolytiques, ne peuvent être réalisées que chez l'animal vivant et ne sont pas remplaçables par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. Ce projet, qui ne peut être réalisé qu'*in vivo* sur animaux vivants, répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) et prend en compte le bien-être animal et les règles éthiques, se décompose 4 procédures :

- Procédure 1 : Evaluation du comportement moteur du modèle de rats KI sEHphosph, à la recherche d'éventuel effet hypo- ou hyper-locomoteur qui pourrait polluer les effets recherchés sur la dépression et/ou l'anxiété.

- Procédure 2 : Evaluation du degré de résignation (une composante de l'humeur dépressive) du modèle de rats KI sEHphosph dans une épreuve de dépression, couramment utilisée pour sélectionner les animaux présentant un comportement de type dépressif : le test de la nage forcée.

- Procédure 3 : Evaluation du degré d'anxiété du modèle de rats KI sEHphosph dans deux épreuves complémentaires l'une de l'autre, à savoir : l'épreuve du double compartiment noir/blanc et l'épreuve du labyrinthe en O surélevé.

- Procédure 4 : Evaluation du comportement alimentaire du modèle de rats KI sEHphosph.

Des désordres liés à l'alimentation, pouvant aller de la perte d'appétit jusqu'à la boulimie étant souvent fréquents au décours des épisodes anxieux et/ou dépressifs, nous évaluerons, en l'absence de tout stress : (i) la consommation alimentaire des animaux, (ii) l'appétence des animaux vis-à-vis de diverses boissons (eau et eau sucrée), en vue de révéler une éventuelle anhédonie, et (iii) la composition corporelle.

Le nombre maximal d'animaux nécessaire à cette étude a été déterminé au moyen des tests statistiques se basant sur les résultats de nos travaux antérieurs et sur ceux des publications dans le domaine, permettant d'évaluer une puissance de résultats suffisante avec le minimum d'animaux. Ce nombre est estimé à 20 rats mâles et 20 rats femelles répartis en deux groupes (10 rats par groupe) d'animaux KO et d'animaux sauvages, qui seront utilisées dans plusieurs épreuves comportementales. Cette répartition permettra d'obtenir des résultats statistiquement analysables et indépendants du cycle ovarien. Les expériences projetées dans le cadre de ce projet n'étant que des observations comportementales de classe légère, dans le but de limiter le nombre d'animaux utilisés, toutes les procédures seront consécutivement menées sur les mêmes groupes d'animaux à des intervalles suffisants pour éviter toute interférence expérimentale. Toutes les expérimentations seront conduites dans des pièces adjacentes aux zones d'élevage et possédant les mêmes conditions de température et d'hygrométrie. Les animaux seront surveillés au sein de l'animalerie et durant les différentes épreuves par les expérimentateurs. A terme, cette étude nous permettra d'ouvrir des perspectives thérapeutiques dépourvues d'effets secondaires et faciliter la prise en charge des patients souffrant de dépression et/ou d'anxiété.

11028 Les bactériophages sont des virus naturels, que l'on trouve partout dans l'environnement, sur notre peau, dans nos intestins, la terre, l'eau... Depuis quelques années, notamment face à la résistance bactérienne croissante aux antibiotiques, la phagothérapie (traitement utilisant des bactériophages) connaît un regain d'intérêt et constitue donc une alternative / une complémentarité potentielle forte à l'antibiothérapie inefficace sur certaines bactéries. Toutefois, l'utilisation de la phagothérapie a

longtemps été pratiquée de façon empirique, et des études sont maintenant nécessaires afin de valider son efficacité en système infectieux complexe.

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'efficacité d'une combinaison de trois bactériophages chez la souris dans un modèle d'infection musculaire bactérienne à *S. aureus*. Deux souches cliniques de *S. aureus* seront testées lors de cette étude. Pour la mise en œuvre de ce projet, 60 souris Balb/c seront nécessaires. Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 5 par groupe (au lieu de 10) grâce à l'expérience acquise lors d'études précédentes sur le modèle lui-même. Des analyses *in vitro* ont déjà été réalisées sur l'efficacité des bactériophages. Toutefois leurs efficacités ne peuvent être confirmées que dans des modèles précliniques (notamment pour des aspects de diffusion tissulaire), c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée. Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance accrue sera également réalisée pour cette étude (raffinement).

11029 Notre projet porte sur la mise en évidence d'anomalies du développement périnatal des neurones moteurs de la moelle épinière de la souris SOD1G93A, modèle murin de la maladie sclérose latérale amyotrophique (SLA). La SLA ou maladie de Charcot est une maladie caractérisée par une dégénérescence des neurones moteurs qui survient pendant la vie adulte et qui conduit à une paralysie fatale. La plupart des études se sont focalisées sur les périodes symptomatiques ou pré-symptomatiques et non sur les mécanismes initiaux conduisant fort probablement à la survenue de la maladie. Notre projet est basé sur nos résultats montrant que le développement des inhibitions est affecté chez la souris SOD1G93A. Nous proposons d'agir pendant la vie fœtale sur les mécanismes impliqués dans la mise en place des inhibitions afin de tester si cela a une répercussion sur la survenue de la maladie lors de la vie adulte. Un développement anormal des inhibitions pourrait avoir des conséquences tardives conduisant à la dégénérescence des neurones moteurs pendant la vie adulte et à la paralysie fatale chez les patients SLA. Notre programme est un premier pas vers de nouvelles stratégies de recherche qui seront essentielles pour diagnostiquer la SLA à des stades précoces. D'un point de vue méthodologique, nous nous engageons à respecter au maximum la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement) :

- Remplacement : des expériences de simulations informatiques sont réalisées afin de remplacer/compléter certaines expériences. Cela permet de remplacer l'utilisation des souris et de réduire le nombre d'animaux.

- Réduction : afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, notre projet basé sur des méthodes variées permet d'utiliser au maximum tous les embryons et animaux néonataux disponibles issus d'une portée. Concernant les expériences réalisées chez l'adulte, un nombre minimum d'animaux est programmé en accord avec les tests statistiques qui seront réalisés à posteriori.

- Raffinement : les souris sont élevées avec un enrichissement. Des points limites sont établis afin de réduire au maximum la souffrance des animaux liée à leur incapacité à se nourrir en fin de vie.

Dans son ensemble, notre projet est basé sur l'utilisation de 1648 animaux sur 5 années de recherche.

11030 Les maladies cardio-vasculaires représentent la première cause de mortalité dans tous les pays industrialisés. Communément appelé "crise cardiaque", l'infarctus du myocarde correspond à la destruction du muscle cardiaque suite à l'obstruction d'une artère, appelée artère coronaire, qui alimente le cœur en sang et donc en oxygène. Le territoire normalement vascularisé est ainsi privé d'oxygène (ischémie) ce qui entraîne la mort des cellules musculaires dans cette zone. Cela entraîne des problèmes de contraction du muscle cardiaque (myocarde), se manifestant par des troubles du rythme, une insuffisance cardiaque, voire l'arrêt du cœur. La gravité de l'infarctus tient à la durée et à la taille de la zone ischémisée : plus l'ischémie est longue et plus la zone obstruée est importante, plus l'infarctus est grave. Si l'atteinte est très étendue, le fonctionnement de toute la pompe cardiaque est altéré.

En France, chaque année, 120000 personnes environ sont victimes d'un infarctus du myocarde. 10 % d'entre elles vont en décéder lors de la crise et le taux de mortalité à un an est de 15%. La seule option thérapeutique est de déboucher l'artère coronaire le plus rapidement possible après le début des symptômes. Cependant, bien qu'efficace pour limiter l'étendue des lésions ischémiques, cette reperfusion de l'artère entraîne l'apparition de nouvelles lésions induites par la ré-oxygénation des tissus.

D'un point de vue thérapeutique, malgré la diversité des stratégies médicamenteuses et non médicamenteuses qui peuvent être mises en place, elles n'apportent pas à ce jour une réponse totalement satisfaisante, leur utilisation peut être accompagnée d'effets secondaires importants et ils ne sont pas efficaces chez tous les patients. Un des axes de recherche consiste à développer des traitements visant à limiter l'apparition des lésions ischémiques et/ou à prévenir les lésions propres à la reperfusion. Cela passe par la réalisation de tests effectués sur des modèles animaux aussi prédictifs que possible. Dans cette optique, différents modèles ont été développés chez plusieurs espèces. L'un des modèles les plus classiquement utilisés est le modèle d'ischémie-reperfusion (I/R) *in vivo* chez le rongeur (rat + souris) qui est le sujet de ce projet. En effet, le rat et la souris possèdent un système cardiaque similaire à celui de l'homme et l'ensemble des paramètres mesurés lors d'une procédure expérimentale d'I/R sont identiques à ceux mesurés chez le patient humain. L'animal développe ainsi des lésions cardiaques reproductibles d'une série expérimentale à l'autre, ce qui en fait un modèle préclinique de choix pour tester l'efficacité de candidats médicaments.

Dans ce projet, en tant que prestataire de services pour différents laboratoires pharmaceutiques développant des candidats médicaments, nous sommes responsables de la partie *in vivo*, à savoir la procédure d'ischémie-reperfusion sur animaux anesthésiés ainsi que de l'estimation de la taille d'infarctus après prélèvements du myocarde sur ces mêmes animaux. Ce projet est estimé sur 5 ans et le nombre total d'animaux a été déterminé par un calcul de $n=50$ animaux par série expérimentale pour un total de 10 séries sur 5 ans, soit 500 animaux. Chaque série expérimentale se compose de 5 groupes et le nombre d'animaux par groupe n'excède généralement pas 10 animaux. Ce nombre d'animaux doit permettre de mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre le groupe contrôle positif et le(s) groupe(s) traité(s) avec un composé de référence. Cependant, cette procédure expérimentale étant majoritairement demandée chez le rat, nous estimons que 8 des 10 séries prévues dans ce projet seront réalisées chez cette espèce, soit $n=400$ et 2 séries seront réalisées chez la souris, soit $n=100$. Ainsi, le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possible, et ainsi réduire au maximum le nombre d'animaux en expérimentation.

Lors de la procédure, l'animal est profondément anesthésié à l'aide d'un mélange anesthésique chimique Kétamine/Xylazine. Ce type d'anesthésie est privilégié par rapport à une anesthésie gazeuse à l'isoflurane qui est cardioprotectrice donc susceptible d'entraîner un biais expérimental. De plus, ce type d'anesthésie chimique permet d'induire une anesthésie chirurgicale profonde et prévient l'apparition de la douleur. Les animaux anesthésiés sont intubés afin d'assister la respiration et ainsi éviter toute dépression respiratoire au cours de l'anesthésie. Les paramètres respiratoires sont ajustés en fonction du poids de l'animal. Par exemple, pour un rat de 300g, le volume courant = 2,2 ml et la fréquence respiratoire = 81 cycles/min. Pour une souris de 30g, le volume courant = 0,2ml et la fréquence respiratoire = 107 cycles/min. Un suivi des paramètres physiologiques est réalisé par monitoring de la température de l'animal et par suivi de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque tout au long de la procédure par un personnel compétent. Un tel suivi des signes cliniques durant la procédure permet de prévenir l'apparition de la douleur ou de la quantifier en cas d'apparition de signaux douloureux. Les points limites seront fixés avant le début de l'expérimentation afin de limiter toutes douleurs inutiles durant la procédure. Cela permet de maximiser le raffinement des conditions de chirurgie et de bien-être pour l'animal. L'animal ne sera pas réveillé à la fin de la chirurgie. Ce protocole est ainsi classé sans réveil.

11031 L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) est le néoplasme le plus fréquent chez l'homme. Des changements pathologiques de ce trouble peuvent être rencontrés chez 50% des hommes âgés de 50 ans et chez 90% des hommes âgés de 90 ans. L'HBP se caractérise par une augmentation de la taille de la prostate. Cette tumeur bénigne va ainsi exercer plus de pression sur l'urètre et la vessie et interférer avec l'écoulement normal de l'urine. L'HBP est une histopathologie caractérisée par une hyperplasie stromale et épithéliale et par un dysfonctionnement de la vessie. Bien que les causes de l'HBP soient encore peu déterminées, les symptômes peuvent être classifiés en deux types : Irritatifs, du fait du dysfonctionnement de la vessie et Obstructifs, au niveau de l'urètre et de la prostate. Ces derniers découlent à la fois d'une prolifération anormale de la prostate et de l'augmentation du tonus basal contractile du muscle lisse urétral et prostatique. Bien que les traitements pharmacologiques existants soient le plus souvent efficaces à court et moyen terme (Anti-muscariniques, alpha-bloquants et inhibiteurs de la 5-alpha réductase), ils n'en restent pas moins symptomatiques et le traitement chirurgical reste inévitable à terme, accompagné d'effets secondaires souvent lourds (dysfonction érectile, infertilité masculine, dépression). Ainsi, les effets secondaires de ces différentes options de traitement continuent de poser des difficultés thérapeutiques et encouragent le développement de nouvelles thérapeutiques plus efficaces qui permettraient idéalement d'éviter le traitement chirurgical. En raison de l'étiologie inconnue de la pathologie, il est nécessaire de conduire une recherche visant tout d'abord à développer et optimiser un modèle animal reproduisant les signes histologiques et cliniques de cette pathologie pour ensuite permettre la réalisation de tests précliniques sur ce modèle visant à réverser le phénotype pathologique induit.

Il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* permettant l'étude de cette pathologie (remplacement) définie par des symptômes et donc difficile à appréhender hors d'une situation physiologique. Dans ce contexte, le modèle préclinique le plus pertinent qui présente des caractéristiques similaires à celles observées dans la pathologie humaine est le rat normal ou spontanément hypertendu (SHR), castré ou non, supplémenté en testostérone ou ocytocine. Les études précliniques menées sur ce modèle conduiront à l'utilisation de 816 rats sur 5 ans. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum nécessaire (réduction) pour réaliser des statistiques acceptables (12 rats par groupe de traitement), du fait des connaissances et de l'expérience du personnel participant au projet et des procédures liées. De plus, des protocoles d'anesthésie et d'antalgie adaptés à la sévérité des procédures expérimentales seront suivis assidûment. Enfin, un suivi systématique, quotidien de l'état général et au moins une fois par semaine et quotidiennement dès la mise en place d'un traitement du poids des animaux, sera réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal. Enfin, les rats seront hébergés par 2 par cage dès que possible, afin de favoriser leur interaction sociale et réduire leur stress et un enrichissement adapté à leur espèce sera mis en place systématiquement (raffinement).

11032 *Yersinia pestis* est l'agent de la peste, une des maladies infectieuses les plus sévères pour l'homme. Non seulement la peste n'a jamais disparu, mais elle réapparaît actuellement dans des régions d'où on la croyait disparue. *Y. pestis* représente également une arme biologique potentielle pour le bioterrorisme. La lutte contre la peste implique principalement les antibiotiques, mais des *Y. pestis* multirésistantes ont été observées. Malgré cette situation, aucun vaccin contre la peste n'est actuellement disponible sur le marché.

Nous avons développé un candidat vaccin, de type vivant atténué, capable de protéger contre la peste sous ses formes bubonique (infection par puce) ou pulmonaire (infection interhumaine par voie respiratoire). Afin d'avancer vers des tests cliniques, nous souhaitons réduire encore les faibles effets secondaires observés. Pour cela, nous allons modifier la souche vaccin en éliminant des gènes possiblement impliqués dans ces effets. Ces modifications pourraient entraîner une diminution de l'efficacité des souches produites en tant que vaccin. Les souches modifiées obtenues seront testées chez la souris pour déterminer leurs effets secondaires potentiels, et vérifier leur capacité à stimuler une réponse du système immunitaire capable de protéger contre la peste bubonique ou pulmonaire. Les souches retenues feront l'objet d'une étude plus approfondie de leur persistance *in vivo* chez l'animal et des effets au niveau tissulaire sur les organes.

La réponse immunitaire induite par vaccination et sa capacité à protéger contre la peste est un phénomène trop complexe pour être modélisé *in vitro* dans toute sa complexité. Le recours à l'animal est donc nécessaire pour cette étude. Ce projet utilisera 4860 souris sur 5 ans. Le projet comprend une procédure de classe légère, et une autre classée sévère du fait de l'infection pesteuse. Ce nombre d'animaux a été obtenu par un calcul de puissance statistique en collaboration avec un biostatisticien, et est basée sur le nombre minimum d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement robustes et reproductibles. Les souris seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification. La vaccination peut provoquer des effets indésirables faibles (pelage hérissé, perte transitoire d'appétit), mais les doses sont calculées de manière à réduire ces effets le plus possible, tout en permettant d'induire la réponse immunitaire protectrice recherchée. Les nouvelles souches évaluées devraient induire encore moins d'effets indésirables que l'original, déjà très atténué. Durant l'infection pesteuse, les animaux seront surveillés tout au long de l'expérience pour détecter tout changement physique ou comportemental qui précède généralement les signes cliniques. Si des animaux atteignent des points limites définis, ils seront mis à mort. Le bénéfice attendu de ce projet est d'améliorer le vaccin et de le faire progresser vers les essais cliniques chez l'homme.

11033 Le projet éducatif a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires de la mémoire à court-terme chez l'homme. Celle-ci permet de conserver des informations pendant un temps très court qui proviennent de nos sens d'où son appellation également de mémoire sensorielle. Cette mémoire se caractérise par la capacité à retenir un petit nombre d'informations ne nécessitant pas d'efforts, ni de connaissance pour être mise en œuvre. Elle se trouve altérée dans certaines pathologies cognitives telles que la maladie d'Alzheimer qui dans ses débuts, touche principalement ce type de mémoire. Ce projet vise à modéliser la mémoire à court-terme chez la souris. Le neurotransmetteur acétylcholine joue un rôle important dans les processus de mémoire à court-terme et de ce fait le protocole consiste au traitement de souris par un antagoniste sélectif des récepteurs cholinergiques (la scopolamine) et d'analyser ensuite le comportement de la souris. Le protocole comportemental utilisé est simple et basé sur la reconnaissance d'objets. Il ne présente aucune douleur et n'occasionne aucun effet néfaste irréversible chez la souris. En effet, le traitement par la scopolamine se fait à faible dose avec un effet réversible. La durée totale de l'expérience est d'environ 2 heures avec une manipulation de la souris pendant 60 min.

Le bénéfice attendu du projet est une meilleure analyse des mécanismes cellulaires de la mémoire à court-terme afin de mieux comprendre les troubles mnésiques, comme ceux retrouvés dans la maladie d'Alzheimer.

Vingt-six souris seront utilisées par an (soit 130 animaux au total sur 5 ans). Cela représente le nombre minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé. Le choix de ce modèle se justifie par la facilité de manipulation, la taille des appareillages et les produits sélectifs de cette espèce à utiliser. Le degré de sévérité que subiront les souris est léger. Les animaux seront surveillés et maintenus dans un environnement protégé. En neurobiologie, les modèles animaux sont utilisés lorsqu'aucune alternative n'est disponible. Par exemple, des biopsies cérébrales ne peuvent pas être envisageables contrairement à d'autres tissus. Les modèles animaux permettent d'étudier un processus spontané ou induit, présentant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain.

11034 Les myopathies congénitales sont des maladies rares sévères et présentant une faiblesse musculaire progressive. Pour diagnostiquer une maladie génétique rare, il est nécessaire d'avoir des échantillons de plusieurs familles mais le nombre restreint de patients rend le diagnostic difficile. Dans notre projet, le modèle de poisson-zèbre sera utilisé pour valider l'effet des mutations trouvées chez les patients et démontrer ainsi leur cause dans la maladie.

Le modèle poisson-zèbre nous permettrait d'évaluer l'effet de mutations trouvées chez des patients atteints de myopathies congénitales car ils sont génétiquement modifiés pour exprimer ces mutations. On a choisi le modèle poisson-zèbre pour donner un diagnostic moléculaire précis et étudier la pathologie de la mutation impliquée pour 2 raisons : 1) Les fibres musculaires des

poissons-zèbre sont très ressemblantes à celles des muscles humains. 2) La génération des modèles de poisson zèbre est plus rapide et à moins de contraintes éthiques que la génération de modèles souris (Remplacement). Le nombre maximum d'adultes à utiliser par gène (300) est requis pour avoir des données suffisamment puissantes statistiquement et ainsi pouvoir donner un diagnostic solide aux patients (Réduction). Les poissons seront surveillés quotidiennement et toute anomalie de leur comportement sera prise en charge en prenant les mesures appropriées afin de respecter le bien-être animal (Raffinement).

Le but de ce projet est d'extraire de l'ADN à partir de biopsies de queue des poissons adultes de 4 à 6 mois afin de faire des analyses moléculaires. Les biopsies de queue se feront sous anesthésie pour éviter de la souffrance animale. De plus, après la biopsie, la nageoire se régénère en moins d'une semaine. Pour valider le diagnostic moléculaire on utilisera 300 poissons adultes par gène muté (150 poissons transgéniques surexprimant la protéine mutée et 150 poissons transgéniques surexprimant la protéine de type sauvage) avec un total de 6 gènes. Le nombre de poissons adultes utilisés sera de 1950 car pour l'un des gènes on étudiera l'effet de 2 mutations trouvées chez les patients. D'autre part, les myopathies congénitales sont caractérisées par des défauts observés en histologie sur des muscles de patients. La présence de ces défauts dans les muscles de ces poissons sera donc étudiée pour valider qu'une mutation dans un de ces gènes est bien la cause de la maladie.

11035 Les troubles cognitifs sont fréquents au cours du vieillissement normal puisqu'il touche jusqu'à 50% des sujets âgés de plus de 55 ans. Les principaux types de troubles cognitifs marqués sont le délire, la démence, la perte d'attention et l'amnésie. Les cas les plus sévères sont associés aux maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la maladie de Huntington où ils constituent un vrai problème socio-économique.

A l'heure actuelle, il y a seulement quatre médicaments (donepezil, rivastigmine, galantamine et memantine) reconnus officiellement pour le traitement des troubles de la mémoire. Les effets de ces molécules restent modestes et elles ne sont pas dénuées d'effets secondaires dont les plus courants sont des troubles gastro-intestinaux. Même si l'origine des troubles de la mémoire demeure inconnue, il est généralement accepté que l'inflammation des tissus nerveux en est une cause probable. De plus, cette inflammation est de plus en plus discutée comme une des origines possibles de la maladie d'Alzheimer et est, dans ce sens, exploitée dans l'élaboration de nouveaux traitements.

Dans ce projet, nous nous proposons d'utiliser le modèle de neuroinflammation induite par le LPS chez la souris pour évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques dans le traitement des pathologies avec troubles de la mémoire. En effet, nous avons montré dans nos expériences préliminaires le rôle central de l'inflammation dans le déficit cognitif induit par le LPS.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R,

Remplacement : aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. En effet, l'inflammation et l'étude de la mémoire implique des interactions multiples et complexes. Bien qu'il soit possible de disséquer les événements individuels en détail avec des études *in vitro*, toutes les interactions impliquées dans la réponse comportementale *in vivo* ne sont pas possibles à simuler *in vitro*.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesures sont mises en œuvre notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement adaptées (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

Réduire : nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 10 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un

résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 3000 souris est envisagée.

11036 En réponse à une lésion cutanée locale, telle une coupure ou une abrasion de la peau, le système immunitaire déclenche une réponse immunitaire et souvent aussi inflammatoire localement impliquant le recrutement de cellules immunitaires. Ainsi, différents types de cellules immunitaires sont acheminés et activés localement tels que les monocytes, les neutrophiles ou encore les cellules lymphoïdes. Cette action du système immunitaire permet la cicatrisation de la plaie. La peau, barrière de protection et tissu de contact avec l'environnement externe, est innervée de capteurs sensoriels l'affleurant. Ce système nerveux sensoriel permet d'appréhender des sensations telles que la chaleur, le froid, la pression forte ou faible, la douceur et la dureté et aussi la douleur. La perception de la douleur cutanée est relayée jusqu'au cerveau grâce aux neurones sensoriels nociceptifs dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions nerveux spinaux (DRG) de la colonne vertébrale et dont les efférences innervent la peau. Le but de ce projet est de déterminer le rôle des neurones sensoriels dans la régulation de la réponse immunitaire et d'analyser les interactions potentielles entre ces neurones et les cellules du système immunitaire dans le cadre d'une douleur induite par la réalisation d'une plaie cutanée. Dans un premier temps, on se propose d'identifier les neurones sensoriels impliqués dans la perception de la douleur locale suite à une blessure cutanée ; pour cela nous travaillerons avec des souris normales commerciales. Puis dans un deuxième temps, d'identifier le ou les rôles des différentes classes des neurones impliqués sur le système immunitaire du point de vue de l'activation mais aussi du recrutement et de la modulation de la réponse immunitaire ; pour cela nous travaillerons avec des souches de souris génétiquement modifiées délétées pour ces classes de neurones sensoriels nociceptifs. Nous estimons que pour répondre convenablement aux réponses scientifiques soulevées, le nombre minimal total de souris nécessaires s'élèverait à 3505 animaux. Les effectifs d'animaux nécessaires seront réduits au minimum selon la loi des 3R. Des lots de 5 souris seront constitués pour chaque condition, chaque groupe et chaque temps testés afin de répondre aux exigences de test statistique de rang non paramétrique. Les expériences seront reproduites au moins une fois afin de s'assurer de la reproductibilité biologique des résultats. Les souris seront hébergées en cages standard sur portoirs ventilés avec de la sciure de bois utilisée comme litière, des rouleaux de coton comme matériau de nidification et de maisons de souris achetées dans le commerce et fournies pour l'enrichissement environnemental. Elles seront hébergées soit isolées soit à raison de 5 souris maximum par cage (même sexe, même âge et provenant de la même portée). Les souris ont un accès *ad libitum* à un bidon d'eau acide et à un régime alimentaire standard ; sont libres de leur déplacement hors restriction minimale due aux bandages de protection inhérent à une procédure expérimentale. Notre projet de recherche s'articulant majoritairement sur la perception et la sensation de la douleur, nous ne pourrons utiliser aucun analgésique lors de nos expérimentations, ni en pré-opératoire ni en post-opératoire, en complément d'une anesthésique générale classique combinant narcotique, myorelaxant et analgésique mineur (mélange de kétamine et xylazine). La compréhension de l'interaction entre les deux systèmes immunitaire et nerveux périphérique permettrait sur le long terme de décortiquer les voies d'activation de la douleur et son implication dans la réponse immunitaire et donc d'améliorer la prise en charge thérapeutique de la douleur dans le cadre d'immunopathologie. L'importance et la complexité des nombreuses interactions cellulaires nécessaires au développement du système immunitaire ainsi qu'à la mise en place d'une réponse immunitaire suite à la stimulation des neurones sensoriels périphériques via une chirurgie cutanée justifient l'utilisation de modèles d'études *in vivo*.

11037 Le mélanome cutané constitue en 2012 en France la 9ème cause de cancer tous sexes confondus avec 11000 nouveaux cas estimés. Les mélanomes ne représentent que 10% des cancers cutanés diagnostiqués en France, mais ils sont toutefois les plus dangereux du fait de leur fort potentiel

métastatique. Le développement du mélanome dans un environnement sain ainsi que l'implantation de ses métastases sont des voies à explorer pour mieux appréhender les mécanismes mis-en-jeu et ainsi proposer des solutions pour les contrecarrer.

Notre molécule d'intérêt a été signalée dans l'environnement de nombreux tissus tumoraux et a été impliquée dans le contrôle du développement de certaines tumeurs cancéreuses. Notre travail a mis en évidence que la présence de cette molécule entraînait un retard de migration et d'invasion des cellules tumorales en culture *in vitro*. Nous avons donc comme projet de mesurer l'effet de notre molécule sur le développement tumorale et l'apparition de métastases dans un organisme entier vivant. Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement des cellules cancéreuses dans un organisme entier vivant. Le comportement de ces cellules dépend de très nombreux facteurs et notamment de son microenvironnement direct. La souris a été choisie comme modèle pour plusieurs raisons : les cellules cancéreuses déjà testées *in vitro* sont issues de la même souche de souris ; elle est parfaitement connue sur le plan anatomique et de nombreux outils moléculaires compatibles sont disponibles. Le stress des animaux sera pris en charge en hébergeant les animaux en groupe, en conservant autant que possible les groupes formés afin de maintenir la stabilité hiérarchique établie et en leur mettant à disposition un enrichissement matériel spécifique à l'espèce utilisée. De plus, les expérimentations seront réalisées sous anesthésie, sur table chauffante en dehors du champ de vision des animaux en attente d'expérimentation. Aucune douleur supérieure à celle produite par l'injection de liquide en sous cutanée n'est attendue. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires le plus rapidement possible. Toute anomalie clinique sera rapportée au responsable sanitaire de l'établissement. Des mesures thérapeutiques seront prises pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés (injection de fluides / analgésiques, isolement, réchauffement, etc.). La croissance des tumeurs sera limitée à de petites tailles (1cm³) et donc ne devrait pas induire de douleur intense. De plus, des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place.

Le nombre d'animaux est limité à un total de 60 souris au maximum sur l'ensemble du projet réparti sur deux ans (soit 30 par an). A l'issue de la première année, l'analyse statistique des résultats pourrait démontrer l'effet de notre molécule auquel cas l'étude s'arrêterait. Dans le cas d'une absence total d'effet, l'étude serait également arrêtée.

L'inoculation de cellules de mélanome étant assez bien documentée dans la bibliographie, les effets attendus de notre molécule d'intérêt sont une diminution significative de la taille de la tumeur primaire accompagnée d'une diminution de la longueur et du volume moyen des vaisseaux sanguins l'alimentant ainsi qu'une diminution du nombre de métastases. La durée de l'étude sera courte et les animaux ne participeront à l'expérimentation que pour une durée de 15 jours maximum et dans le respect des points limites spécifiés ci-dessus afin de limiter au minimum les dommages éventuels dus au développement de la tumeur. A l'issue de cette période de 15 jours, les animaux seront euthanasiés et autopsiés.

11038 Les pathologies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité et le vieillissement de la population en accroît l'importance. De plus, des pathologies comme l'hypertension artérielle, le diabète ou les pathologies ischémiques (coronariennes, cérébrales, rénales ou périphériques) surviennent d'autant plus fréquemment que l'âge des sujets avance. De manières générales les femmes sont moins atteintes de maladies cardiovasculaires que les hommes mais cette tendance s'inverse après la ménopause, laissant penser à un rapport de cause à effet entre la production d'hormones féminines (œstrogènes) et une protection des accidents vasculaires. Au laboratoire depuis plusieurs années nous nous intéressons au rôle du récepteur aux œstrogènes dans la fonction vasculaire. Le remodelage aux flux dépend de l'activation des récepteurs alpha (ERα) aux œstrogènes. Nous aimerions comprendre le rôle de ce récepteur aux œstrogènes au niveau de sa fonction nucléaire ligand dépendante dans la réactivité vasculaire ainsi que dans le remodelage

artériel en réponse aux modifications de flux et/ou de pression artérielle. Cet aspect sera étudié plus en détail par l'utilisation d'un modèle de souris génétiquement modifié pour la fonction AF2 du récepteur aux œstrogènes. Pour cette étude 1200 animaux seront nécessaires au maximum. Nous appliquons la règle des 3R. Toutes les procédures chirurgicales seront accompagnées d'une analgésie pré- et post-opératoire (injection de Buprénorphine à 0,1 mg/kg). L'animal sera suivi au réveil et dans les premières heures suivant l'opération, puis quotidiennement. Une grille de score pour l'évaluation de la douleur sera utilisée avec détermination du point limite. Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle *in vitro*, car le remodelage vasculaire met en jeu le système immunitaire et hormonal. Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Nous utiliserons le test de Student et des tests d'Anova deux voies Avec post-test de Bonferroni. Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux de plus les cages sont enrichies par des jouets.

11039 Notre projet de recherche vise à caractériser l'implication des gènes CDK8 et CDK19 dans le principal cancer du foie, le carcinome hépatocellulaire. CDK8 a été identifié comme un oncogène dans le cancer colorectal, mais rien n'est connu quant à son implication dans le carcinome hépatocellulaire. Ce cancer est la deuxième cause de décès liée au cancer dans le monde, et son incidence est en augmentation. Ce mauvais pronostic vital des patients est dû notamment à une absence d'approche thérapeutique satisfaisante. Il est donc essentiel de poursuivre des travaux de recherche afin d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires liés à l'apparition du carcinome hépatocellulaire. Dans cette optique, l'utilisation de modèles animaux est une étape indispensable pour valider les résultats préliminaires obtenus *ex vivo*. Dans le cas du carcinome hépatocellulaire, le modèle animal utilisé par la communauté scientifique et médicale est la souris, *mus musculus*. Nous allons utiliser comme modèle animal une lignée de souris permettant l'inactivation du gène *Cdk8* spécifiquement dans les hépatocytes, afin de comparer la réponse du foie de souris dépourvu ou pas de ce gène en réponse à différents stress, notamment un régime enrichi en gras. Ce projet est conforme aux exigences des 3R, intégrant les notions et exigences de remplacement, réduction et raffinement.

Remplacement : Nous avons réalisé toute la première partie de l'étude *ex vivo*, avec des lignées hépatiques. Il est désormais nécessaire de confirmer et étendre les résultats obtenus dans un modèle permettant de reproduire la complexité de l'organe et le développement de la pathologie, qui ne peut être qu'un modèle animal, la souris. Il n'existe pas d'autre alternative que l'utilisation d'un modèle animal de la pathologie humaine.

Réduction : Une analyse bibliographique poussée et des expériences *ex vivo* ont été réalisées afin de définir précisément les questions à poser et limiter le nombre d'animaux utilisés. Nous avons effectué avec le service de statistiques de notre institut les calculs permettant de déterminer qu'un nombre de 160 souris est le nombre minimum (Réduction) afin de mener à bien l'étude tout en gardant des résultats exploitables en terme statistique.

Raffinement : Les procédures expérimentales sont très bien définies et ont été publiées. Les points limites sont déterminés et aucune dérogation n'est nécessaire. Les animaux utilisés au cours de cette expérience seront maintenus dans des conditions optimales intégrant tous les aspects garantissant le bien être de l'animal. Les procédures sont réalisées par du personnel qualifié et habilité dans le cadre de la réglementation définie par les dispositions européennes et nationales et formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux. Les retombées de ce projet sont importantes pour une meilleure compréhension du carcinome hépatocellulaire et la possibilité de développer un jour des approches thérapeutiques satisfaisantes pour la pathologie humaine particulièrement dévastatrice.

11040 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la 2ème cause de mortalité dans le monde, et l'une des causes majeures de handicap acquis. Environ 80% des AVC sont dits ischémiques, c'est-à-dire induits par une interruption de la perfusion sanguine cérébrale. La majorité des AVC ischémiques

est liée à l'occlusion d'une artère cérébrale par un caillot (thrombus) transporté par la circulation sanguine jusqu'aux artères cérébrales (embolie cérébrale). La reperfusion du tissu cérébral peut être réalisée pharmacologiquement à l'aide d'un traitement thrombolytique. A l'heure actuelle, le rt-PA (Altéplase) est le seul médicament thrombolytique ayant reçu une autorisation de mise sur le marché dans l'indication de la phase aiguë de l'AVC ischémique thromboembolique. Ce traitement possède de nombreuses limitations : fenêtre thérapeutique courte, efficacité limitée chez 70% des patients, neurotoxicité, risque de transformation hémorragique. Depuis quelques années, la thrombectomie (destruction mécanique du caillot) a démontré son efficacité dans le cas d'une thrombose localisée au niveau des artères importantes au cours des 12h suivant l'AVC. Néanmoins de nombreux patients restent sans solution thérapeutique. La possibilité d'administrer un traitement neuroprotecteur limitant la progression de la lésion et/ou favorisant la réhabilitation permettrait d'améliorer la prise en charge des patients.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets neuroprotecteurs d'un médicament (Produit X), déjà sur le marché pour une autre indication, dans un modèle préclinique d'AVC thrombo-embolique chez le rat. Le traitement sera effectué en absence ou en présence d'Altéplase (rt-PA), le traitement pouvant avoir un effet différent si la reperfusion est précoce ou non. Le nombre et la complexité des mécanismes mis en jeux au cours de l'ischémie-reperfusion du tissu cérébral chez l'Homme ne sont actuellement pas modélisés par des méthodes alternatives, alors qu'ils sont présents de façon similaire chez le Rat (Remplacement).

Au total, 112 rats mâles Wistar seront utilisés pour ce projet. Les animaux seront répartis en 4 groupes expérimentaux : 1) groupe contrôle, 2) groupe traité avec rt-PA, 3) groupe traité avec le produit X, 4) groupe traité avec la combinaison rt-PA + Produit X. Les déficits neurologiques seront évalués au cours des 7 jours suivant l'AVC. Des prélèvements de cerveaux seront réalisés en fin de protocole pour évaluer les lésions cérébrales.

Les rats seront placés à 4 par cage, dans des cages ayant une superficie de 1800 cm², dès leur arrivée, avec une feuille de papier absorbant comme dispositif d'enrichissement. Sur la base de notre expérience du modèle précédent, le nombre de rats utilisés pour chaque étude sera réduit au minimum (Réduction) garantissant une interprétation statistique et scientifique des résultats (Raffinement).

Chaque rat sera soumis au maximum à 5 procédures : tout d'abord à un prélèvement de sang de 0,4 ml à une des veines de la queue pour préparer des caillots ou thrombi (P1), puis à l'induction sous anesthésie gazeuse de l'AVC par injection de thrombi de taille calibrée au niveau de l'artère carotide en direction du cerveau et la mise en place d'un accès au niveau des veines de la queue pour l'administration des traitements (P2). Le rt-PA sera administré par voie intraveineuse 1h30 après l'induction de la thromboembolie sur animaux vigiles (P3) pendant 1h par perfusion. Le Produit X sera administré par injection i.p. au même moment, puis quotidiennement pendant 6 jours (P4).

Des tests neurologiques sensorimoteurs seront effectués 48 heures, 5 jours et 7 jours après induction de l'AVC en plaçant les animaux un par un dans un dispositif expérimental (espace ouvert de 60x40cm avec mûr de 20 cm) pendant 10 minutes environ, dans une pièce attenante à l'animalerie, afin d'évaluer les déficits neurologiques (P5).

Une surveillance soutenue des animaux sera réalisée au cours des 7 jours. Tout animal présentant une crise de convulsion supérieure à 3 minutes ou une incapacité à se déplacer avec abolition des réactions aux stimuli extérieurs et une perte complète des réflexes posturaux à 2h ou une incapacité à se déplacer avec perte complète des réflexes posturaux entre 24h et 7 jours, sera mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques.

Les animaux seront placés à 4 par cage à leur arrivée puis en cage individuelle à partir de l'induction de l'AVC jusqu'à leur mise à mort afin de faciliter leur récupération de la chirurgie, de leur administrer les traitements et de les surveiller. Les animaux disposeront d'une feuille de papier absorbant dans leur cage comme enrichissement (Raffinement).

11041 Le cancer est à ce jour la seule pathologie chronique majeure pour laquelle la plupart des patients sont obligés de se rendre à l'hôpital pour recevoir leur traitement. Pour les autres pathologies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, l'asthme, le diabète ou le VIH, le patient se procure son traitement à la pharmacie la plus proche et gère de manière autonome la prise de son traitement. Cette différence est liée à la voie d'administration des médicaments. Pour les maladies précitées, ils sont disponibles sous forme de comprimés, d'inhalations, voire d'injections sous-cutanées comme l'insuline pour les diabétiques. Pour la majorité des anticancéreux, ces voies d'administration simples n'existent pas. Ils doivent être administrés par perfusions intraveineuses qui se déroulent sur plusieurs heures. Elles nécessitent une reconstitution du produit à la pharmacie de l'hôpital et la pose par une infirmière. De plus, sachant que les anticancéreux doivent être administrés à intervalle régulier toutes les 1 à 3 semaines, ce mode de prise en charge est contraignant pour le patient. Cette prise en charge a aussi un coût important lié à la complexité du circuit. Des problèmes organisationnels se posent également car le nombre de patients atteints de cancer est en constante augmentation et les hôpitaux se retrouvent surchargés. Le développement de nouvelles voies d'administration qui soient faciles d'utilisation est donc primordial pour permettre la prise en charge du patient à domicile. Deux voies d'administrations sont principalement utilisées dans ce but : la voie orale et la voie sous-cutanée (SC). La première est certainement la plus développée car elle a l'avantage d'être facile d'utilisation avec les formes comprimés ou gélules. Son inconvénient principal est que la biodisponibilité (quantité de principe actif qui se retrouve dans le sang) est faible, variable et difficilement prévisible. Ces problèmes ont limité l'utilisation de ces formes orales. Nous pensons sur ce point que la voie SC est supérieure à la voie orale car elle permet une biodisponibilité plus élevée et mieux contrôlée.

Notre but est de développer une nouvelle approche permettant d'administrer efficacement les chimiothérapies déjà présentes sur le marché par voie SC et non par voie intraveineuse. L'utilisation de prodrogue polymère pour transporter les principes actifs offre des solutions potentielles pour le développement de traitements qui soient plus efficaces et moins toxiques pour le patient. Cette technologie consiste à coupler chimiquement le principe actif (PA) à un polymère innovant afin de modifier les propriétés physico-chimiques de la molécule thérapeutique et ainsi maximiser son absorption. Le médicament qui est sous forme de prodrogue sera inactif au niveau du tissu SC et n'entraînera donc pas de toxicité à ce niveau. Une fois dans la circulation sanguine le principe actif sera libéré et retrouvera son activité anticancéreuse. Nous avons mené des études sur un modèle murin et avons pu montrer que notre technologie permet l'administration d'un anticancéreux normalement irritant (le paclitaxel) par voie SC sans aucune réaction toxique. Par des études de pharmacocinétique nous avons pu voir que le PA est bien libéré une fois dans la circulation sanguine et récupère donc son activité. Ces résultats sont prometteurs et pour continuer à avancer dans le développement pharmaceutique, il nous faut maintenant mener ces études sur une deuxième espèce. Nous avons choisi le lapin car c'est le meilleur modèle d'étude de la toxicité sous cutanée.

A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour l'étude de l'innocuité SC. Durant leur transport dans l'organisme depuis le site d'administration, les médicaments sont soumis à une métabolisation qui peut provoquer l'apparition de métabolites issus de la dégradation pouvant être plus ou moins toxiques. La réponse d'un organisme entier n'est à l'heure actuelle pas remplaçable par une modélisation ou une analyse *in vitro*. Il est donc indispensable d'évaluer la tolérance locale au niveau du tissu SC et sur animal entier pour tenir compte de ces phénomènes.

Les études préliminaires *in vitro* et *in vivo* chez un modèle murin nous ont permis de cribler les différentes formulations et seulement 4 formulations seront testées *in vivo* chez le lapin, ce qui permet une réduction du nombre de ces animaux. Une étude en plusieurs temps avec analyse intermédiaire nous permet de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité de l'étude. Pour la réalisation de l'étude de d'innocuité nous utiliserons au maximum 30 lapins sur 1 an. Des points limites d'expérience ont été identifiés en amont de la mise en place de ce projet afin de limiter la douleur et le mal-être des animaux.

11042 La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative chronique caractérisée par l'apparition progressive de symptômes moteurs (tels que des mouvements ralentis, des tremblements, une rigidité des membres) et cognitifs extrêmement invalidants pour les patients. C'est le second trouble neurodégénératif le plus fréquent après la maladie d'Alzheimer et il débute habituellement entre 45 et 70 ans.

Les causes de la MP restent relativement mal connues.

Il n'existe pour le moment aucun traitement permettant de ralentir l'évolution de cette maladie chez les patients. Néanmoins, des thérapies innovantes sont actuellement testées chez des patients dans le cadre d'essais cliniques. En particulier, une molécule agissant en tant qu'inhibiteur de relargage du glutamate, est actuellement en cours d'essai clinique de phase II chez des patients atteints de maladie de Parkinson à un stade avancé. Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur majoritaire dans le cerveau. En condition normale, la concentration extracellulaire en glutamate est bien régulée car c'est elle qui module la neurotransmission. Cependant, cette régulation peut être perturbée dans le cadre de la maladie de Parkinson, induisant une concentration trop élevée du glutamate, ce qui a des conséquences toxiques à long terme. Le but de cette molécule est d'agir sur l'inhibition du relargage de glutamate pour tenter de réduire ou de limiter sa concentration dans l'espace extracellulaire.

Cette molécule a déjà démontré des effets bénéfiques :

- dans un modèle préclinique en association avec un médicament utilisé pour traiter certains symptômes de la maladie (la lévodopa),
- et dans une petite étude clinique de preuve-de-concept réalisée chez 7 patients parkinsoniens.

Cependant, les mécanismes d'action de la molécule restent mal connus. L'objectif de ce projet est donc d'affiner les connaissances sur le mode d'action de ce composé et de voir dans quelle mesure l'inhibition du taux de glutamate peut avoir des effets sur la survie neuronale. Le projet prévoit d'étudier par IRM l'effet du composé sur la quantité de glutamate dans le cerveau. Il est basé sur l'utilisation d'une méthodologie innovante qui permet de mesurer de façon non invasive la quantité de glutamate dans le cerveau d'un rongeur, aucun milieu de culture ou simulation numérique ne permettant aujourd'hui de reproduire la complexité du métabolisme énergétique du cerveau. Le niveau de glutamate sera mesuré dans le cerveau des animaux par IRM avant et après administration de la molécule candidate. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet, sont nés et élevés dans un élevage agréé. Le projet prévoit l'utilisation de 8 rats sains. Ce nombre a été déterminé en fonction des expériences à réaliser et de la sensibilité de la méthode d'investigation couramment utilisée dans le laboratoire. Les examens IRM sont effectués sous anesthésie générale et avec application locale d'analgésique afin d'éviter tout stress ou douleur liés au système de positionnement de l'animal qui diminuerait le bien-être des animaux. Le suivi quotidien et l'application de critères d'arrêt de l'expérience sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus qui compromettraient le bien-être des animaux.

11043 La douleur est un système d'alerte physiologique essentiel au maintien de l'intégrité physique des individus. Néanmoins la perception douloureuse peut devenir pathologique et devenir purement délétère. Cette situation de « maladie » de la perception douloureuse est la plus fréquemment rencontrée dans diverses neuropathies périphériques. Deux situations cliniques majeures de ces neuropathies ont pour origine les traitements de chimiothérapie, et les séquelles d'altération traumatique des nerfs périphériques. Ces neuropathies représentent une part très importante de la population (8%) avec un coût sociétal énorme. Le grand problème des cliniciens est que la réponse thérapeutique face à ces neuropathies est inadaptée. L'arsenal thérapeutique est très limité, et repose sur des médicaments qui sont soit inefficaces soit avec des effets indésirables importants. Il est donc important de faire avancer les connaissances sur ces maladies du système de perception de la douleur pour proposer des alternatives thérapeutiques. Notre projet d'équipe se situe dans ce contexte.

Dans le cas du cancer du côlon, le traitement de référence -chimiothérapie à l'oxaliplatine- a pour effet indésirable majeur d'entraîner une hypersensibilité au froid, douloureuse, chez les patients, et

des démangeaisons. Cette interférence peut provoquer l'arrêt de la chimiothérapie, au risque de moins bien traiter le cancer. Dans le cas des neuropathies périphériques d'origine traumatiques, les patients perçoivent des douleurs amplifiées et/ou perçoivent comme douloureuses des stimulations qui ne le sont pas normalement. Ces douleurs anormales se modélisent chez la souris (respectivement par l'injection d'oxaliplatine ; et par traumatisme induit par section de branches du nerf sciatique), ce qui permet de tester des traitements, et d'étudier les causes moléculaires et cellulaires de ces douleurs afin de proposer et valider de nouvelles cibles thérapeutiques. Le recours à l'expérimentation animale est indispensable car 1) la douleur est une sensation qui ne peut être quantifiée que chez l'être conscient ; 2) il n'existe pas de modèles *in vitro* ou de modèles mathématiques permettant de progresser dans les traitements des douleurs chroniques. Notre projet pour 5 ans impliquant une équipe de recherche nécessitera 3912 souris issues de plusieurs lignées spécifiques.

Nous travaillons sur la perception et la propagation douloureuses, permises par l'activité électrique des neurones, qui elle-même est produite par des protéines particulières (codées par des gènes spécifiques). Dans des conditions physiologiques, les communications électriques entre neurones sont équilibrées et correctement organisées. Quand une douleur chronique s'installe et persiste, les niveaux d'expression de nombreux gènes sont modifiés dans les neurones sensoriels, pour conduire à une perception amplifiée et/ou erronée des stimuli extérieurs. Nos recherches ont montré que le canal calcique Cav3.2, une protéine essentielle au rythme de l'activité électrique des neurones, est particulièrement impliquée dans ces processus anormaux. Toutefois, on ne sait pas où et quand ces canaux participent dans la douleur chronique, et surtout, si (ou comment) ces canaux pourraient constituer des cibles pharmacologiques thérapeutiques. Ces deux grandes questions peuvent être abordées de manières scientifiquement et éthiquement avantageuses chez la souris.

Notre démarche est conforme à la règle des 3R et aux recommandations sur l'éthique de l'expérimentation animale de la douleur. En effet, *in vivo*, nous cherchons des seuils douloureux, et pas plus, dans les explorations des effets antalgiques/analgésiques d'une molécule candidat médicament ciblant le canal Cav3.2. De plus, l'utilisation de souris génétiquement modifiées qui présentent des propriétés bien calibrées, permet d'augmenter la précision des résultats et la portée des conclusions. Nous exploitons au mieux nos élevages, puisque nous étudions mâles et femelles, et que nous étudions la majorité des génotypes produits. Par ailleurs, notre étude *in vitro* préalable (non douloureuse), qui détaille les fonctions de cette cible pharmacologique (dans les neurones sensoriels et dans la moelle épinière), permet de mieux cibler les traitements expérimentaux et d'extrapoler leur pertinence chez l'homme.

11044 Lorsque les cellules sont exposées à des substances chimiques ou rayonnements qui endommagent leur ADN, elles activent des mécanismes de réparation afin de maintenir leur intégrité et assurer leur survie. Les mécanismes de réparation de l'ADN impliquent plusieurs types de protéines qui interagissent entre elles : des protéines clés des voies de réparations et d'autres protéines « dites modulatrices », capables d'activer ou d'inhiber les premières. Ces voies seraient impliquées dans la résistance aux traitements anticancéreux (chimiothérapie et/ou radiothérapie).

Ainsi, une meilleure connaissance des mécanismes de réparation de l'ADN et l'identification des protéines qui les contrôlent sont cruciales pour l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques de ces cancers radio- et chimio-résistants. De plus, l'évaluation *in vivo* est indispensable pour (1) intégrer les réponses au niveau tissulaire et de l'organisme et (2) identifier et évaluer les éventuels effets secondaires. Le projet proposé est basé sur des études préalablement réalisées au laboratoire sur des modèles cellulaires. Ces études ont permis d'identifier une protéine qui protège les cellules irradiées ou exposées à des agents utilisés en chimiothérapie. Cette protéine exerce son effet protecteur en modulant l'activité d'une protéine clé d'une voie de réparation de l'ADN.

Notre projet vise à évaluer *in vivo* l'action de cette protéine modulatrice. Comme il n'est pour le moment pas possible d'utiliser de méthode alternative pour étudier les effets à l'échelle d'un organisme entier chez l'humain, nous étudierons le rôle de ces protéines dans le modèle rongeur.

Pour cela, nous utiliserons plusieurs lignées de souris transgéniques pour lesquelles un ou deux gènes cibles de notre étude ont été inactivés. Les thérapies anticancéreuses étant très délétères pour le système hématopoïétique des patients, nous créerons un modèle de rongeur dont le gène codant une des protéines clés de la voie de réparation de l'ADN à laquelle nous nous intéressons est inactivé spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques afin de mieux comprendre son rôle dans ce tissu. Nous comparerons les effets à court et moyen termes de l'exposition des animaux à une radiothérapie ou une chimiothérapie en fonction des caractéristiques génétiques des animaux (génotype) selon des critères de survie, de comportement et/ou de perte de poids importante sur plusieurs jours. Des approches histologiques et immunohistochimiques permettront de comparer au niveau tissulaire et cellulaire les effets de ces traitements en fonction du génotype des animaux. Des cultures de cellules issues de ces tissus cibles seront également effectuées afin d'étudier les mécanismes mis en jeu. Pour l'ensemble du projet, nous évaluons le nombre d'animaux nécessaire à 3982 pour 5 ans (soit 796 par an). Au cours de cette période les expériences seront menées progressivement et tout protocole induisant un stress ou une souffrance inattendue lors des premières expérimentations sera arrêté. Le nombre d'animaux a été réduit à une valeur minimale tout en garantissant la validité statistique et l'utilité des expériences qui seront menées. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Leur état de santé sera surveillé quotidiennement tout au long des expériences. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de stress ou de souffrance. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. L'ensemble de ce travail devrait nous permettre de contribuer à l'évaluation préclinique de la protéine modulatrice de la réparation de l'ADN que nous avons identifiée comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de tumeurs résistantes aux traitements classiques et/ou comme critère de « personnalisation » des traitements adaptés à des types de tumeurs ou de patients présentant des caractéristiques génétiques particulières.

11045 La dépression, qui est aujourd'hui la maladie psychiatrique la plus répandue avec une prévalence de 6 à 10% en Europe, représente un problème majeur de santé publique. En dépit de cette fréquence élevée et du coût économique de sa prise en charge, la compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la dépression reste encore limitée à ce jour. La recherche préclinique est donc indispensable afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques sous-tendant la dépression et les clés de sa guérison. De nombreuses données (obtenues notamment dans notre laboratoire) montrent que la composante inflammatoire est impliquée dans le développement des symptômes dépressifs ainsi que dans la résistance aux traitements antidépresseurs. Par ailleurs, notre laboratoire a identifié que les oméga-3 issus de l'alimentation étaient des régulateurs puissants de l'inflammation cérébrale, capables de protéger des troubles émotionnels et cognitifs. Dans ce contexte, l'objectif de notre projet est d'identifier les mécanismes neurobiologiques par lesquels les oméga-3 ont un rôle protecteur dans les troubles émotionnels et cognitifs induits par un épisode d'inflammation aiguë.

Notre hypothèse est que les oméga-3 issus de l'alimentation, en modulant les réseaux neuronaux et leur capacité plastique, peuvent protéger le cerveau des épisodes inflammatoires sévères induisant des troubles anxieux et dépressifs. Afin de tester notre hypothèse, nous allons soumettre des souris à 3 régimes différents, équilibrés, carencés ou enrichis en oméga-3 pendant 8 semaines. Nous analyserons ensuite le comportement des souris, ainsi que la plasticité des réseaux cérébraux suite à un stimulus inflammatoire aigu provoqué par l'injection de fragments bactériens. La force de notre étude est que nous allons mener l'étude chez des souris mâles et femelles, car les mécanismes chez la femelle sont très peu connus encore.

Notre étude comporte 18 groupes car nous allons combiner plusieurs facteurs : 3 régimes en oméga-3, 3 doses d'inflammation et 2 sexes. De plus, notre étude comportera 3 cohortes : 1 pour l'étude des comportements cognitifs, 1 pour l'étude des comportements émotionnels et 1 pour l'étude de la plasticité cérébrale. Pour chaque groupe, nous réduirons le nombre d'animaux à 10-12, car nos expériences passées montrent que c'est le minimum nécessaire pour obtenir une puissance statistique suffisante. Ainsi, cette étude sur 3 ans nécessite un total de 636 souris mâles

et femelles. Afin de maximiser l'utilisation faite des animaux, de nombreux prélèvements tissulaires post-mortem seront effectués pour des analyses subséquentes.

Ce projet de physiologie intégrée comprenant notamment l'analyse des comportements et des réseaux neuronaux ne peut être effectuée que sur des animaux de laboratoire. En effet, les lignées cellulaires existantes à ce jour ne forment pas des réseaux neuronaux permettant d'étudier notre question de recherche. Par ailleurs, les données de la littérature sont encore insuffisantes pour mener nos recherches sur des modèles computationnels. Enfin, nos recherches sont trop invasives pour être menées directement chez l'Homme.

Dans cette étude, aucune douleur ou stress sévère ne sera infligé aux animaux. Les animaux seront hébergés en groupes de 5 ou 6 congénères et ils bénéficieront d'un enrichissement comportemental. Leur état de santé sera vérifié quotidiennement et ils seront pesés une fois par semaine. Si un animal présente des signes de mauvaise santé, il sera isolé, soigné, et sacrifié en cas de non-amélioration dans les 24h. Les animaux seront sédatisés et anesthésiés avant d'être euthanasiés. Cette étude de recherche fondamentale apportera des connaissances importantes sur le rôle protecteur des oméga-3 dans les troubles de l'humeur induits par une inflammation aiguë.

11046 Les cellules lymphoïdes innées de type 3 (ILC3) jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire précoce à l'infection bactérienne et fongique, ainsi que dans le maintien de l'homéostasie de l'hôte avec son microbiote symbiotique. Elles sont aussi impliquées dans le développement fœtal et postnatal des tissus lymphoïdes, et interagissent avec le système nerveux afin de coordonner les réponses immunitaires et comportementales aux perturbations infectieuses et environnementales. Les ILC3s sont similaires en phénotype et fonction aux cellules lymphocytaires T appelées Th17, et par conséquent, il a été difficile de les étudier sans affecter les cellules Th17, et donc de leur attribuer un rôle spécifique. Nous avons développé 2 lignées de souris transgéniques qui permettent d'éliminer les ILC3s sans endommager les cellules Th17, et donc de mesurer les conséquences, au sein du système immunitaire, d'une absence spécifique d'ILC3s. Dans ce projet, nous proposons de mesurer l'impact de l'élimination des ILC3s dans ces 2 modèles de souris, au niveau de l'immunité, de la physiologie et du microbiote intestinal. Dans un deuxième temps, nous chercherons à comprendre le rôle des ILC3s dans les réponses circadiennes et postprandiales, qui sont essentielles pour éviter que l'intestin soit source d'infection systémique et de dérèglements métaboliques.

Ces études impliquent l'interaction complexe entre des cellules immunitaires de plusieurs types, du métabolisme et du microbiote intestinal, interactions qu'il est impossible de reconstituer *in vitro*. Par contre, tous les outils sont réunis pour effectuer cette étude chez la souris. Des animaux adultes des deux sexes seront utilisés, au nombre total estimé à 1468. Nous proposons cinq procédures expérimentales de sévérité modérée, pour explorer les multiples fonctions des ILC3s. Aucune méthode de remplacement n'est envisageable pour l'étude de phénomènes physiologiques aussi complexes, mais nous limitons le nombre de souris utilisées au minimum statistique possible (nombre déterminé avec le logiciel G*power), et planifions des procédures dont le raffinement méthodologique vise à respecter le bien-être des animaux et réduire tout stress ou souffrance éventuels. L'expérimentateur sera attentif à toute souffrance décelée chez les animaux et des points limites sont définis afin de mettre fin à cette souffrance au plus tôt le cas échéant.

11047 Le trouble anxieux généralisé est un problème de santé publique majeur touchant 4 à 8% de la population mondiale. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine sont prescrits en 1ère intention mais sont limités, entre autres, par un taux élevé de rechute et un délai d'action retardée. Ces inhibiteurs stimulent indirectement et de façon non spécifique tous les récepteurs de la sérotonine. Une étude récente suggère que le récepteur 5-HT4 (qui est un des sept récepteurs de la sérotonine) pourrait être un nouvel espoir de traiter rapidement et efficacement les troubles anxieux. Ainsi, ce projet expérimental a pour objectif l'étude d'agonistes du récepteur 5-HT4 chez la souris BALB/cJRj mâle qui est une souche de souris qui présente naturellement des comportements de type anxieux.

Premièrement, cinq agonistes du récepteur 5-HT4 nouvellement générés seront évalués. Nous étudierons les conséquences comportementales d'une administration sub-chronique de ces agonistes) qui seront administrés avant chaque test comportemental) en les comparant à un agoniste de référence le RS 67333 ainsi qu'à une benzodiazépine et à un antidépresseur. L'administration d'un antagoniste de ce récepteur sera également effectuée de façon à s'assurer de la sélectivité d'effet de ces composés. L'étude des caractéristiques comportementales sera évaluée par différents tests non invasifs prédictifs de la réponse anxiolytique. Deuxièmement, le meilleur des composés sera alors sélectionné et sa caractérisation sera plus poussée en évaluant l'effet son administration chronique avec un traitement de 5 semaines. Troisièmement, nous identifierons les circuits impliqués dans les effets anxiolytiques rapides de cet agoniste du récepteur 5-HT4. Pour ce faire, la technique d'optogénétique sera utilisée, qui permet grâce à l'utilisation d'un virus, d'inhiber ou d'activer l'activité neuronale à l'aide d'une fibre optique placée en intracérébrale.

Pour l'ensemble de ce projet, 1500 souris BALB/cJRj mâles seront utilisées, en prenant en compte la règle des 3R. Il s'agit de réduire le nombre d'animaux, de raffiner la qualité des expériences et de remplacer si possible l'expérimentation animale. Dans l'état actuel des connaissances, modéliser *in vitro* ou *in silico* des troubles de l'humeur n'est pas possible. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire pour étudier ces pathologies. De plus, la technique d'optogénétique présente l'avantage de générer une quantité importante de données pour chaque animal et permet d'utiliser chaque animal comme son propre témoin (laser allumé vs laser éteint). Au cours des semaines de traitements, une surveillance quotidienne sera entreprise pour veiller au bien-être des animaux (quantité de boisson et de nourriture adéquats, utilisation d'anesthésiques, et points limites définis). Globalement, l'ensemble de ce projet constitue une étape importante du développement préclinique d'un agoniste du récepteur 5-HT4. Cette cible est intéressante dans l'optique du développement d'une nouvelle stratégie pour le traitement des troubles anxieux.

11048 Plusieurs peptides et toxines issues des animaux ont pour cible principalement des canaux ioniques, les récepteurs membranaires et les composants du système sanguin avec une affinité qui peut être élevée. Les venins animaux sont largement distribués à travers le monde. Ces venins sont des mélanges complexes de composés avec des fonctions physiopathologiques spécifiques. Les venins et leurs composés ont déjà montré qu'ils pouvaient avoir une action pharmacologique d'intérêt : dont certains prescrit en clinique ou sont utilisés en tests cliniques. Ces molécules complexes contenus dans les venins sont pourtant peu étudiés et moins de 0,01% de ces toxines ont été identifiés et caractérisés, alors qu'ils sont considérés comme des bibliothèques de traitements dans lesquelles chaque composé est actif sur un plan pharmacologique et est un potentiel futur traitement. De manière intéressante l'action de certaines autres substances pharmacologiques naturelles comme les extraits de plantes et séquences d'acides aminés (peptides) ou d'acides nucléiques (aptamères) constituent au même titre que les venins un réservoir à traitements encore sous-estimé. Il est apparu lors d'une étude interne précédente que ces autres substances peuvent contrer très spécifiquement certain venins en ciblant des composés particulièrement actifs, ce qui a un intérêt clinique considérable. Depuis une trentaine d'années, les cônes passionnent les scientifiques pour une autre raison : leur venin. Les toxines contenues dans ces venins, nommées conotoxines, perturbent le fonctionnement du système nerveux ou des muscles. Ce qui induit une perte de comportement locomoteur, d'exploration et de coordination. Les cônes utilisent une panoplie de conotoxines qui agissent en synergie afin de paralyser leurs proies. Des travaux menés récemment au sein de notre équipe sur les composés issus de venins et d'extraits de plantes. Plusieurs toxines issues de venins ont montré des effets spécifiques intéressants qui en font des bons candidats thérapeutiques. Cela implique d'étudier plus avant leurs mécanismes et leurs effets. Ici chaque composé a déjà été soumis à des études préliminaires. Les études les plus avancées concernent la α C-conotoxin PrXA, toxine issue d'escargot marin, dont les effets sur la perturbation du comportement général de la souris semblent être totalement annihilés par l'injection d'un aptamère spécifique dont la réaction doit être caractérisée.

Dans le travail que nous comptons réaliser, il sera question d'étudier les effets d'une toxine, la α C-conotoxin PrXA et de son interaction avec un aptamère sur le comportement d'exploration, la

locomotion et la coordination motrice chez la souris afin de compléter les données déjà acquises. Cette étude vise à identifier de nouvelles molécules issues des produits naturels aux potentiels thérapeutiques mais aussi à caractériser pharmacologiquement leurs interactions sur leurs cibles moléculaires, et à exploiter ces ligands pour leurs effets bénéfiques.

Une meilleure compréhension physiopathologique du rôle des toxines provenant de venins, et de son interaction avec un aptamère permettra l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Les résultats préliminaires obtenus chez la souris ont montré des effets intéressants néanmoins non reproductibles sur un autre modèle que le modèle animal et l'organisme dans sa complexité et son ensemble : l'interaction, l'intégration de signaux physiopathologiques complexes ne pouvant être reproduits autrement que par l'organisme entier, l'utilisation de modèle animal est obligatoire.

Pour cela nous envisageons de :

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire à l'obtention de données statistiquement significatives. Le maximum d'études sera fait dans la mesure du possible et le maximum de données sera enregistré sur un même animal afin d'éviter la réduction du nombre d'animaux utilisés. Une étape de mise au point est prévue afin de déterminer pour chaque composé à tester la concentration la plus propice à l'étude afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et le nombre de procédures.

Par conséquent le nombre d'animaux est fixé au maximum à 6 souris par groupe.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- les expériences seront réalisées sur un nombre réduit d'animaux ;
- Acclimatation des animaux aux pièces et aux personnes ;
- Monitoring de la température
- points limites définis (douleurs et comportements)

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences *in vivo* sur souris seront remplacées par des études *in vitro* sur cellules. Cette étude se déroulera en 2 étapes soit l'administration des traitements aux animaux et l'évaluation des paramètres comportementaux chez l'animal placé dans l'arène ouverte.

Nous prévoyons d'utiliser 18 souris pour ce test pharmacologique.

Au total 18 souris seront réparties de la manière suivante :

- un groupe de 6 souris témoin négatif ;
- un groupe test de 6 souris traitées par la toxine ;
- un groupe test de 6 souris co-traitées par la toxine et l'aptamère.

11049 L'autisme et les troubles du spectre autistique (TSA) forment un groupe de pathologies d'origine neurodéveloppementales qui touchent environ 1 enfant sur 59. Les facteurs génétiques, ainsi que les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans l'étiologie de cette maladie complexe. Caractérisée par des troubles de la communication, des problèmes d'interactions sociales, des comportements répétitifs stéréotypés, ainsi que des troubles liés à un traitement anormal de l'information sensorielle (hypersensibilité ou hyposensibilité sensorielle) les TSA posent un fort défi pour les familles des enfants atteints de cette maladie. À ce jour, il n'existe aucun traitement pharmacologique ciblé pour améliorer la vie des individus atteints de TSA. Les objectifs de ce projet, de caractère générique, sont 1) de caractériser les défauts de traitement de l'information sensorielle chez les modèles murins de TSA 2) de définir, à partir de ces données, les mesures physiologiques susceptibles de modification par les molécules thérapeutiques et 3) de tester les nouvelles molécules pharmacologiques afin de déterminer leur potentiel thérapeutique. Pour mener nos études, nous utilisons une approche d'imagerie, effectuée sur des animaux sous anesthésie. Les bénéfices attendus de notre projet de recherche est une meilleure compréhension des mécanismes neurobiologiques sous-jacents de cette maladie, et, à terme, l'identification de nouvelles stratégies

thérapeutiques pour améliorer les symptômes de cette maladie. Pour réaliser ce projet de fort impact préclinique, le modèle animal est indispensable.

En accord avec le principe des 3Rs (réduction, raffinement, remplacement), nous avons réfléchi à notre projet de recherche de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés ainsi que la souffrance imposée par la procédure détaillée dans ce document. Réduction : afin de ne pas utiliser plus que le nombre minimal d'animaux nécessaires pour que nos résultats soient statistiquement exploitables, nous avons estimé (selon les études précédentes) la taille d'échantillon requis. Raffinement : les animaux seront hébergés d'une manière adaptée à leurs besoins et recevront une surveillance quotidienne. La séance d'imagerie sera effectuée sous anesthésie ; plusieurs raffinements sont prévus pour veiller au confort de l'animal (utilisation d'une crème oculaire, stratégie pour éviter la déshydratation, maintien d'une température physiologique, utilisation d'un antidouleur local). Les études pilotes permettent la mise au point de la procédure. Remplacement : Le projet porte sur l'étude du traitement de l'information sensorielle dans le néocortex. Il nécessite, donc, la présence de circuits intacts, permettant la transmission des signaux électriques entre le système nerveux périphérique et le système nerveux central et entre les différentes zones cérébrales. Le modèle animal est absolument nécessaire pour reproduire la complexité de ces interactions neuronales et ne peut pas être remplacé par les études *in vitro* ou *in silico*. Certaines études antérieures ont été réalisées chez la drosophile et le poisson zèbre. Cependant les systèmes sensoriels de ces organismes sont très différents de celui des mammifères (ils manquent notamment la structure cérébrale ciblée chez l'homme) et le remplacement par ces modèles n'est pas possible. Néanmoins, pour veiller aux obligations de remplacement, nous avons conçu une stratégie expérimentale qui comprend la mise au point de nos approches thérapeutiques lors des tests *in vitro*. Seules les molécules ayant un effet bénéfique *in vitro* seront testées chez l'animal anesthésié. Nous avons estimé le nombre maximum d'animaux nécessaires à ce projet crucial à 2176 animaux.

11050 Contexte : Les venins animaux sont largement distribués à travers le monde. Ces venins sont des mélanges complexes de composés avec des fonctions physiopathologiques spécifiques. Par exemple les peptides et toxines isolés à partir de venins ciblent principalement les canaux ioniques, les récepteurs membranaires et les composants du système sanguin avec une affinité qui peut être élevée. Les venins et leurs composés ont déjà montré qu'ils pouvaient avoir une action pharmacologique d'intérêt : dont certains prescrit en clinique ou sont utilisés en tests cliniques. Ces molécules complexes contenus dans les venins sont pourtant peu étudiés et moins de 0,01% de ces toxines ont été identifiés et caractérisés, alors qu'ils sont considérés comme des bibliothèques de traitements dans lesquelles chaque composé est actif sur un plan pharmacologique et est un potentiel futur traitement.

De manière intéressante l'action de certaines autres substances pharmacologiques naturelles comme les extraits de plantes et séquences d'acides aminés (peptides) ou d'acides nucléiques (aptamères) constituent au même titre que les venins un réservoir à traitements encore sous-estimé. Il est apparu lors d'une étude interne précédente que ces autres substances peuvent contrer très spécifiquement certains venins en ciblant des composés particulièrement actifs, ce qui a un intérêt clinique considérable.

Des travaux menés récemment au sein de notre équipe sur les composés issus de venins et d'extraits de plantes. Plusieurs toxines issues de venins ont montré des effets spécifiques intéressants qui en font de bons candidats thérapeutiques. Cela implique d'étudier plus avant leurs mécanismes et leurs effets. Ici chaque composé a déjà été soumis à des études préliminaires. Les études les plus avancées concernent la α C-conotoxin PrXA, toxine issue d'escargot marin, dont les effets sur le système respiratoire semblent être totalement annihilés par l'injection d'un aptamère spécifique dont la réaction doit être caractérisée.

Objectifs : Dans le travail que nous comptons réaliser, il sera question d'étudier les effets d'une toxine, la α C-conotoxin PrXA et de son interaction avec un aptamère connu sur le système respiratoire chez la souris afin de compléter les données déjà acquises. Cette étude vise à identifier de nouvelles molécules issues des produits naturels aux potentiels thérapeutiques mais aussi à

caractériser pharmacologiquement et structurellement leurs interactions sur leurs cibles moléculaires.

Résultats attendus : Une meilleure compréhension physiopathologique du rôle des toxines provenant de venins et des aptamères permettra l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans la fonction respiratoire.

Les résultats préliminaires obtenus chez la souris ont montré des effets intéressants néanmoins non reproductibles sur un autre modèle que le modèle animal et l'organisme dans sa complexité et son ensemble : l'interaction, l'intégration de signaux physiopathologiques complexes ne pouvant être reproduits autrement que par l'organisme entier, l'utilisation de modèle animal est obligatoire.

Pour cela nous envisageons de :

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire à l'obtention de données statistiquement significatives. Le maximum d'études seront faites dans la mesure du possible et le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal afin d'éviter la réduction du nombre d'animaux utilisés. Une étape de mise au point est prévue afin de déterminer pour chaque composé à tester la concentration la plus propice à l'étude afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et le nombre de procédure.

Par conséquent le nombre d'animaux est fixé au maximum à 6 souris par groupe.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- les expériences seront réalisées sur des animaux anesthésiés ;
- en fin d'expérience, des organes seront prélevés sur les animaux anesthésiés, et les différents tissus seront prélevés post mortem.

Remplacer : Ici le modèle animale et l'étude de la fonction respiratoire et des réponses et voies intégrées doivent passer par l'étude *in vivo*. Toute autre expérimentation ne nécessitant pas l'utilisation d'animaux est prévue sur des modèles cellulaires et/ou informatiques.

Cette étude se déroulera en 2 étapes soit l'administration des traitements aux animaux et l'évaluation des propriétés respiratoires. Nous prévoyons d'utiliser 18 souris au total pour ce test pharmacologique, réparties de la manière suivante :

- un groupe de 6 souris témoin négatif ;
- un groupe test de 6 souris traitées par la toxine avec une unique ;
- un groupe test de 6 souris co-traitées par la toxine et l'aptamère ;

11051 Conformément aux exigences réglementaires (entre autres directive 2001/82/EC et amendements), des études *in vivo* de pharmacocinétique et d'efficacité des produits vétérinaires doivent être réalisées sur la ou les espèces cibles, suivant la voie d'administration, à la posologie préconisée. Aucune méthode alternative *in vitro* ne permet à ce jour de remplacer ces études sur carnivores domestiques.

Ce projet concerne l'évaluation de l'efficacité d'un produit innovant par le suivi de critères de pharmacocinétique et pharmacodynamie chez un carnivore domestique, dans le cadre d'un dossier d'autorisation de mise sur le marché.

Après une période d'acclimatation et d'habituation aux conditions expérimentales, les animaux reçoivent le produit au plus tôt à l'âge de 12 semaines et au maximum 2 fois. En fonction de l'objectif recherché, la date d'administration du produit et durée de l'effet évalué, deux études au maximum pourront être réalisées. Ces études prévoient un suivi des animaux en bonne santé, pendant une durée maximum de 3 ans pour les paramètres suivants :

- suivi du principe actif dans le sang afin de déterminer les facteurs pharmacocinétiques impliqués dans les processus d'absorption, distribution, métabolisme et élimination (ADME),
- suivi ou injection d'hormones dans le sang, évaluation des organes et/ou des comportements sexuels.

Les prises de sang (nombre, volume prélevé, période de récupération) sont réalisées conformément aux recommandations éthiques.

Un groupe d'animaux témoins pourra être inclus dans cette étude. De plus, afin d'évaluer les comportements sexuels, un nombre limité de femelles non traitées avec le produit sont incluses dans ces études. Des procédures chirurgicales sont réalisées afin d'éviter tout risque de gestation et limiter le nombre d'animaux dans l'étude. Ces procédures sont sous anesthésie générale (avec suivi de l'anesthésie et du réveil des animaux), antidouleur et antibiothérapie.

Lors de ces études, les animaux sont observés quotidiennement, pesés et examinés régulièrement. Des points limites sont mis en place précocement et spécifiquement pour chaque étude. Les animaux sont hébergés en groupe et ont accès à des enrichissements du milieu spécifique à l'espèce.

Le nombre d'animaux sera limité et justifié pour chaque étude, et est estimé à 56 carnivores domestiques, mâles et femelles confondus pour la période de 5 ans. A l'issue de la procédure, les animaux pourront tous être placés ou être réutilisés.

11052 L'objectif est d'étudier dans quelle mesure des primates non-humains qui n'ont pas développé à l'état naturel l'utilisation d'une monnaie, peuvent tout de même présenter des attitudes de spéculation et de thésaurisation dans le cadre de prise de décision dans le risque, et de déterminer les mécanismes décisionnels (comportementaux et neuronaux) qui rendent possible l'utilisation d'une monnaie.

Cette étude sera réalisée sur 4 primates d'espèce *Macaca mulatta*. La tâche à effectuer par les deux primates sera une tâche en chaise de contention devant un écran. Chaque essai de cette tâche consiste à faire un choix par appui tactile dont les conséquences se répercutent sur le niveau d'une jauge. Au bout d'une dizaine d'essais, le singe obtient une quantité d'eau proportionnelle au niveau de la jauge. Afin de conserver la motivation des animaux, les animaux sont placés sous restriction hydrique du lundi au vendredi, mais conservent un accès *ad libitum* à l'eau durant le week-end. Les signes de déshydratation seront quotidiennement évalués (test du pli cutané pour tester l'élasticité de la peau) et en cas de déshydratation la restriction hydrique sera immédiatement arrêtée. Notons que l'alimentation demeure *ad libitum* durant toute la durée de l'expérience afin d'apporter les apports énergétiques quotidiens suffisants. Pour la réalisation de ce projet, chaque animal subira une chirurgie sous anesthésie générale et en condition d'asepsie afin de manipuler et d'enregistrer par la suite l'activité cérébrale de chaque animal lorsqu'il exécute la tâche comportementale.

Ce projet devrait permettre de mieux comprendre comment le cerveau fonctionne durant les processus de prise de décision. La prise de décision est une fonction cérébrale complexe qui dysfonctionne dans de nombreuses pathologies telles que la maladie de Parkinson ou les troubles obsessionnels compulsifs. Ainsi, ce projet contribuera également à l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques pour les patients atteints de ce type de déficits.

Le but de ce projet est de déterminer les mécanismes électrophysiologiques qui sous-tendent la prise de décision en établissant des corrélations et des liens de causalité entre des modifications d'activité neuronale et des ajustements comportementaux. Par conséquent, l'utilisation du modèle animal reste indispensable dans le cadre de cette étude. Ici, l'étude est effectuée sur des primates non-humains pour les raisons suivantes : (1) aucun primate non-humain n'a à notre connaissance recours à l'utilisation d'une monnaie à l'état naturel, un mammifère de cette ordre constitue ainsi un bon modèle de sujet naïf ; (2) un primate non-humain est un modèle de rationalité limitée ; (3) travailler chez le primate non-humain permet d'étudier les mécanismes électrophysiologiques qui sous-tendent la prise de décision chez un modèle animal possédant un répertoire comportemental qui se rapproche de celui de l'homme. Nous avons choisi de travailler spécifiquement sur le macaque rhesus car *Macaca mulatta* est une espèce très étudiée dans le champ de la neuro-économie. L'utilisation de macaques dans notre étude permet ainsi de pouvoir prendre appui sur cette littérature. Les macaques participant à l'étude seront au nombre de quatre (correspondant au nombre d'animaux qui permet d'atteindre un équilibre en reproductibilité des résultats et réduction

du nombre d'animaux). Les animaux seront hébergés ensemble, dans une structure spécialement agréée pour l'hébergement et l'utilisation des primates en recherche, disposant d'équipements et de protocoles adaptés au raffinement du milieu pour cette espèce (nourriture variée, « jouet », fond sonore, etc.). Enfin, pour s'assurer au mieux du bien-être de ces animaux, ils sont et seront observés et scorés par le personnel compétant quotidiennement, sur des critères comme la posture de l'animal, son activité, son interaction, sa nutrition etc.

11053 Le glioblastome (GBM) est le cancer cérébral le plus fréquent chez l'adulte, et malgré les protocoles de traitements les plus lourds (chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie), le taux de récurrence est supérieur à 90%. Ces cancers ont en effet d'importantes capacités d'invasion du tissu sain et de résistance au traitement, particulièrement la radiothérapie qui dans certains cas rend les cellules tumorales plus invasives.

Afin de développer des approches thérapeutiques, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes cellulaires responsables de la résistance des cellules tumorales aux thérapies et de leur dissémination.

Une des hypothèses envisagées serait que les cellules tumorales utilisent le microenvironnement des vaisseaux sanguins à la fois pour résister aux traitements et comme support pour migrer et envahir les régions saines du cerveau. Ce processus de dissémination est appelé co-option vasculaire. Les mécanismes permettant aux cellules tumorales d'atteindre les vaisseaux et de s'y mouvoir sont actuellement inconnus.

Le projet de recherche attendant à cette demande est d'élucider le lien entre la co-option vasculaire, la radiorésistance et l'action des rayonnements sur les propriétés invasives des cellules de glioblastome.

Une des premières étapes sera d'observer l'effet des radiations sur le processus de co-option *in vivo*. La seconde sera d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la co-option dans des modèles *ex vivo* de microenvironnement vasculaire. Il nous est cependant impossible de recréer cet environnement à l'identique car c'est un système complexe aux paramètres extrêmement nombreux et dont la plupart sont inconnus.

Ainsi, il sera nécessaire d'étudier le comportement des cellules tumorales dans leur environnement physiologique en utilisant la microscopie biphotonique intravitale chez la souris. Cette technique permet de suivre individuellement et au cours du temps le déplacement et l'invasion des cellules tumorales injectées, et ce directement dans le microenvironnement du cerveau. Ces observations sont impossibles par une approche traditionnelle (injection de cellules tumorales, sacrifice d'animaux à différents temps puis étude sur tissus).

La présente demande porte sur la mise en place des techniques d'observation intravitale de cellules tumorales dans le cerveau de souris ainsi que des procédures expérimentales attendant à ces observations que sont la pose de fenêtre crânienne suivie par l'injection de cellules tumorales en intracérébral. 3 objectifs sont à atteindre :

- 1- L'acquisition des gestes chirurgicaux par les membres de l'équipe.
- 2- Evaluer la tolérance des souris à ces procédures et si nécessaire, apporter les adaptations techniques, environnementales ou thérapeutiques (e.g. analgésiques, antibiotiques) permettant aux souris de mieux supporter ces procédures.
- 3- Evaluer notre capacité d'observation intravitale de 3 lignées de cellules tumorales humaines avec le matériel de microscopie biphotonique en place.

Nous réaliserons ces expériences sur des souris femelles adultes immunodéficientes, condition nécessaire à la transplantation de cellules tumorales humaines. Nous utiliserons dans ce projet 90 souris : 24 animaux pour l'objectif 1, entre 20 et 30 pour l'objectif 2 (selon les adaptations nécessaires) et 36 (12 par lignée tumorale) pour l'objectif 3.

Cette demande est une étape de mise au point d'actes chirurgicaux et d'observation sur animaux vivants. Elle ne permet pas l'utilisation d'approches de remplacement des animaux. Nous

procéderons cependant à plusieurs adaptations qui réduiront le nombre d'animaux sacrifiés et leur souffrance.

- L'atteinte de l'objectif 1 passera tout d'abord par une étape d'acquisition des gestes sur animaux morts. De plus seuls 12 des 24 animaux de cette étape seront réveillés, les autres seront euthanasiés avant réveil leur épargnant toute souffrance post-opératoire.

- Pour les objectifs 2 et 3, les animaux recevront avant, pendant et après les opérations les traitements antibiotiques et analgésiques adaptés au maintien de leur bien-être suivant les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie. De plus, le suivi des animaux sera fait quotidiennement et leur bien-être évalué selon une grille de score. Si nécessaire, ils recevront les soins adaptés (e.g. aliments hydratés, isolement, analgésiques...) et seront sacrifiés si le point limite défini par la grille de score est atteint.

- Enfin il est important de signaler qu'observer dans un même animal, un même groupe de cellule avant et après traitement réduira considérablement (facteur 5) le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats significatifs dans les demandes à venir.

11054 La rapidité et la qualité de la cicatrisation d'une plaie dépendent de l'état général de l'organisme, de la cause de la lésion, de son état et localisation et de la survenue ou non d'une infection. Le produit concerné par cette étude a été développé pour favoriser la cicatrisation en lui fournissant des conditions favorables. Certaines plaies particulièrement profondes peuvent laisser apparaître des structures dites nobles telles que des os ou des tendons et peuvent avoir lieu dans des zones telles que l'abdomen où des organes internes peuvent potentiellement être exposés. Le produit ayant été développé dans un but de couverture cutanée, il est nécessaire d'évaluer son comportement au contact de ces structures pour pouvoir élargir son indication à ce type de plaies très profondes. Le présent projet vise donc à évaluer le comportement de ce produit de cicatrisation lorsqu'il est mis en contact avec des organes nobles tels que l'os, le tendon, le péritoine ou l'intestin.

Deux porcs sont inclus dans l'étude. Le dispositif est appliqué sur le tendon du jarret et sur l'os tibial d'un animal et sur le péritoine et l'intestin grêle de l'autre. Dans une optique de raffinement, deux porcs sont utilisés afin d'éviter une intervention trop lourde avec une anesthésie de longue durée sur un seul animal. De plus, les porcs arrivent sur place une semaine avant la procédure pour leur permettre de s'habituer au lieu et ainsi de diminuer leur stress. Une visite clinique préopératoire a lieu la veille de l'opération pour contrôler leur santé générale et avoir des données basales. Après l'intervention les animaux sont gardés trois semaines dans l'établissement utilisateur. Un suivi clinique quotidien est mis en place (consommation alimentaire et hydrique, température, fréquences cardiaque et respiratoire, tonicité, évaluation de la douleur) afin de détecter toute dégradation de l'état de l'animal. En outre, bien que le niveau de douleur postopératoire attendu soit faible, une analgésie est mise en place durant trois jours. En parallèle un suivi sanguin la veille de la procédure, trois jours après puis deux et trois semaines après est appliqué. Trois semaines après la pose du produit, les porcs sont mis à mort et les produits retirés pour observer l'adhérence aux tissus ainsi que la réaction des tissus grâce à des prélèvements histologiques en périphérie et au cœur de chaque dispositif. Aucun simulateur ne permettant actuellement de mimer la cicatrisation des tissus étudiés, il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux vivants dans ce projet. Le porc a été choisi pour sa proximité anatomophysiologique avec l'humain. L'utilisation de deux animaux au cours de cet essai de faisabilité et de tolérance permet de diminuer les risques pour les animaux qui seront ensuite utilisés lors des tests d'efficacité. Cela permet donc de diminuer le nombre d'animaux utilisés au cours du développement du produit (réduction).

Pour leur bien-être, les deux porcs sont hébergés ensemble dans un box, agrémenté de jouets, et d'une superficie de 5,3m². En cas de température inférieure à 10 degrés dans l'animalerie, un système de chauffage individuel est activé.

11055 La réponse inflammatoire est généralement bénéfique pour l'organisme car elle le protège efficacement contre les infections et permet la réparation des tissus lésés suite à une blessure. Cependant lorsque l'inflammation est chronique ou excessive, elle devient délétère causant des syndromes auto-inflammatoires pouvant aller jusqu'à la mort du patient. L'inflammation est donc

très finement contrôlée. Un nombre croissant d'études souligne le rôle de l'inflammation chronique dans la progression de pathologies aussi répandues que le diabète de type 2, la maladie de la goutte, la maladie de Alzheimer, l'athérosclérose ou le cancer. L'identification et la caractérisation des mécanismes moléculaires régulant l'inflammation pourront déboucher sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques antiinflammatoires pour lutter contre les pathologies sus-citées. Le modèle animal constitue un modèle de choix pour l'étude de la voie des inflammasomes *in vivo*, en effet l'homologie entre le génome humain et celui de la souris nous permettra de mieux comprendre les voies de signalisations impliquées lors d'une mauvaise régulation des inflammasomes.

Le DSS (Dextran Sodium Sulfate), utilisé dans un modèle *in vivo* permet d'induire une inflammation au niveau du colon appelé colite. La colite induit l'activation de la voie des inflammasomes.

L'objectif de ce projet sera donc d'étudier, les différentes voies de signalisations impliquées lors de l'activation des inflammasomes.

- « Remplacer » les modèles animaux : Notre projet se focalise sur un modèle expérimental nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure.

- « Raffiner » Nous testerons 5 lignées et limiterons le nombre de souris par groupe à 20/lignées. Les souris génétiquement modifiées incluent dans l'étude non pas de phénotype dommageable. Les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée afin de détecter les points limites que nous avons fixées (perte de poids, diarrhées, léchage du ventre).

Nous avons déterminé que 100 souris maximum seront nécessaires pour mener ce projet à son terme.

11056 Les conditions environnementales fluctuent au cours d'une même journée, ainsi de nombreux organismes ont développé un mécanisme d'anticipation de ces changements prédictibles, appelé horloge circadienne (circa diem : environ un jour, en latin), permettant de produire une réponse optimale face à un stimulus stéréotypé. De plus, il a été démontré qu'une dérégulation des horloges circadiennes étaient impliquées dans certaines maladies ou syndromes (exemple : troubles du sommeil, obésité, dépression, susceptibilité à certains cancers). Comprendre les mécanismes de régulation des horloges paraît donc essentiel.

Chaque cellule du corps possède une horloge circadienne, et toutes ces horloges sont synchronisées grâce à la lumière et au cerveau. En effet, la photopériode (alternance jour-nuit) est le principal Zeitgeber (minuteur, en allemand) influençant l'horloge circadienne. L'information lumineuse est perçue par la rétine, puis intégrée dans le cerveau avant d'être transmise aux horloges périphériques. Le cerveau joue ainsi un rôle de 'super horloge' qui synchronise toutes les horloges de l'organisme.

Cependant, la lumière n'est pas le seul facteur capable d'influencer les horloges circadiennes : la prise alimentaire a elle aussi un effet majeur sur l'horloge biologique. Si les prises de nourriture sont en phase avec la photopériode, le cerveau joue son rôle de 'super horloge' et toutes les cellules du corps sont synchronisées sur le rythme de la lumière (et entre elles). Mais lorsque la prise de nourriture n'est plus en phase avec la photopériode, l'influence de chaque facteur environnemental varie en fonction des organes. En effet, les cellules du cerveau sont plus sensibles à l'influence de la photopériode, mais un organe tel que le foie, qui joue un rôle essentiel dans la digestion, sera davantage soumis à l'influence de la prise alimentaire. Ainsi, deux informations environnementales 'contradictoires' peuvent conduire à une perte de synchronisation des horloges du corps.

Jouer sur les phases de lumière et sur l'accessibilité à la nourriture permet donc de modifier les phases des horloges biologiques sur différents organes. Nous aimerions donc effectuer des expériences de modifications des phases lumineuses et d'accessibilité à la nourriture sur des souris afin d'étudier les mécanismes qui contrôlent les horloges biologiques. Par ailleurs, il a déjà été

montré que certains facteurs jouaient un rôle essentiel dans le maintien et l'établissement des horloges circadiennes. L'utilisation de souris qui ne possèdent pas ces facteurs est un autre moyen permettant l'étude des horloges biologiques que nous souhaiterions utiliser.

Les procédures qui sont envisagées ici sont donc tout d'abord des expériences de restriction alimentaire temporaire, de modifications du rythme d'éclairage, et l'utilisation de lignée de souris modifiées génétiquement, toutes employées dans le but de mieux comprendre les mécanismes de régulation des horloges biologiques d'une part, mais aussi l'impact des horloges biologiques sur divers processus biologiques.

Nos recherches reposent sur des modèles *in vitro* de culture cellulaire quand c'est possible, cependant avoir recours à un organisme entier est parfois nécessaire dans la mesure où les horloges ne sont pas seulement établies à l'échelle d'une cellule mais de l'organisme entier. Conformément aux exigences de remplacement, réduction et raffinement, les souris seront utilisées à minima, sans compromettre les objectifs du projet et tout en permettant une exploitation statistique des résultats. Des procédures de surveillance quotidienne du bien-être des animaux seront mises en place afin de limiter au maximum la souffrance subie par l'animal.

Ce projet concernera au maximum 630 souris.

11057 Le cancer reste un des problèmes majeurs de Santé Publique et son incidence est encore très élevée en dépit des recherches intensives menées. Notre intérêt se porte sur les protéines de stress (HSP) et leurs implications dans le développement tumoral. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la protection cellulaire contre les agressions, mais aussi dans le métabolisme cellulaire en dehors de tout stress. Les HSP peuvent être classées en 5 familles en fonction de leur poids moléculaire. Nous nous intéressons à la protéine la mieux conservée au cours de l'évolution et la plus étudiée, HSP70. Constamment exprimée dans la cellule cancéreuse, elle a un rôle essentiel dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques, favorisant ainsi le développement tumoral. Compte-tenu du rôle clé d'HSP70 dans le cancer, l'un des projets phare de notre groupe est de développer des inhibiteurs spécifiques d'HSP70. Nous avons mis au point des inhibiteurs capables de lier spécifiquement HSP70. Nous avons démontré chez la souris, les effets anticancéreux en association avec la chimiothérapie standard. Ce qui constitue la première étape préclinique pour ces candidats médicaments.

D'autre part, la protéine de stress HSP70 est retrouvée extracellulaire, sous la forme de nanovésicules (exosomes). Nous avons démontré qu'HSP70 extracellulaire active des cellules bloquant l'immunité contre la tumeur. Le blocage d'HSP70 extracellulaire par nos inhibiteurs permet de rétablir la réponse immunitaire antitumorale et d'arrêter la croissance tumorale. Ces exosomes semblent impliqués dans l'apparition des métastases, mais actuellement aucun mécanisme n'a été mis en évidence.

Dans ce projet, en utilisant la même molécule (inhibiteurs) nous souhaitons explorer deux axes :

- Thérapie anticancéreuse, mener nos inhibiteurs d'HSP70 en clinique : Nous étudierons le comportement dans l'organisme de ces inhibiteurs (distribution, élimination, toxicité) par imagerie optique et par TEP. Nous étudierons l'impact des inhibiteurs associés aux immunothérapies, sur la croissance tumorale.

- Implication des exosomes dans l'apparition des métastases : étude de la biodistribution *in vivo* des exosomes et détermination de la demi-vie. L'injection d'exosomes cancéreux marqués (par l'inhibiteur de HSP70), dans des souris non porteuses de tumeurs permettrait également de déterminer si les exosomes contribuent à la formation de masse tumorale.

HSP70 semble être un marqueur universel de cancer, nous travaillerons avec diverses cellules de cancers qui seront injectées aux souris (modèle le plus proche de l'homme et déjà établi antérieurement). Les expériences seront réalisées sur des souris C57/BL6, BALB/C ainsi que sur des souris immunodéprimées nude et SCID au minimum 3 fois. De nombreuses combinaisons thérapeutiques (fonction de la lignée cellulaire et inhibiteurs +/- les traitements standards) seront réalisées avec un minimum de 3 souris par groupe. Les souris ne pouvant être remplacées par une

étude *in vitro*, nous veillerons à respecter la règle des 3R en limitant au maximum le nombre d'animaux utilisés, et en appliquant les points limites établis.

Nous estimons que 450 souris seront nécessaires durant l'ensemble du projet. Tout au long de ce projet, nous optimiserons au maximum chaque expérience afin d'obtenir le plus d'information et nous réaliserons seulement les expériences les plus indispensables sur les modèles vivo. De plus, nous veillerons à limiter la douleur des animaux au maximum. En effet, un suivi du poids des animaux sera réalisé et nous veillerons à ce que l'état général des animaux soit bon (vérification de la posture et de la pilosité). Le volume des tumeurs sera suivi tous les deux jours, et les souris seront sacrifiées avant que les tumeurs n'atteignent la limite de 2500 mm³ et seulement dans le cas où cela n'occasionne aucune gêne et souffrance pour la souris.

11058 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires destinés à être administrés au chien, des études de tolérance et/ou d'efficacité sont requises pour justifier de la sécurité et de l'efficacité du candidat-médicament.

L'objectif du projet (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de tolérance locale chez le chien, et/ou de l'efficacité du produit en développement dans des modèles induits d'otite et de prurit (signe clinique caractéristique d'allergie cutanée). Plusieurs études pourront être requises pour répondre à l'ensemble de ces questions selon l'état d'avancement du développement du produit.

Ces informations sont exigées par les autorités pour la constitution du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du produit final. Ces études doivent être conduites dans l'espèce cible dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs (remplacement, réduction et raffinement).

L'espèce cible est le chien, jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études. Le nombre d'animaux inclut dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit et la finalité de l'étude (évaluation de la tolérance, preuve de concept d'efficacité, validation de l'effet pharmacologique) et dans le respect des textes réglementaires, lignes directrices correspondantes en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 300 animaux.

Le projet (dénommé par la suite protocole cadre) vise à définir les conditions de réalisation des études de tolérance et/ou d'évaluation de l'effet pharmacologique chez le chien sans compromettre l'atteinte de l'objectif et dans le respect du bien-être animal

- tous les traitements et prélèvements seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU et aucun d'entre eux n'est susceptible d'induire de dommage ni de souffrance chez l'animal,

- depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,

- pour une meilleure surveillance et une prise en charge rapide des animaux en cas d'anomalie, ces derniers pourront éventuellement être suivis par vidéo surveillance,

- les points limites sont, entre autres, toute altération inattendue du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit dans les jours suivant les traitements, perte de poids ; toute observation laissant présager un début de mal-être est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour protéger l'animal

- les animaux sont hébergés à demeure pendant 4 à 5 ans et pourront participer plusieurs fois aux procédures décrites dans le présent projet. La décision de réutiliser un animal dans une procédure expérimentale sera prise par le vétérinaire si les conditions de l'article R2014-1 13 du Code rural et de la pêche maritime sont remplies.

Ce projet couvre également le recueil de sang dans le but de préparer des matrices témoins requises pour la validation des méthodes de dosage des échantillons générés dans ce projet.

11059 La douleur intestinale est un symptôme commun dans la population générale et chez les patients atteints du syndrome de l'intestin irritable (SII), chez qui elle est associée à une hypersensibilité viscérale. Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est un trouble fréquent, il est la cause de 30 à 50% des consultations auprès d'un gastroentérologue et toucherait de 10 à 15% de la population des pays occidentaux. Les symptômes sont invalidants pour les patients et sont caractérisés par des périodes de diarrhée et /ou constipation. Les causes du SII ne sont pas clairement identifiées mais seraient liées au mode de vie, à l'alimentation, à la dépression, à l'anxiété et aux infections rendant la prévention du SII difficile. Le SII d'origine infectieuse peut également entraîner une inflammation du tractus intestinal et altérer la barrière intestinale. En effet, une apparition de ce syndrome est souvent observée suite à un épisode de gastroentérite. Chez les patients atteints de SII, une dysbiose a été également mise en évidence. Dans le laboratoire nous avons mis en évidence les effets analgésiques de probiotiques spécifiques (bactéries et levures) dans le modèle de distension colorectale chez le rat qui permet d'évaluer les seuils de la douleur viscérale. Des études plus récentes dans le laboratoire ont également montré que l'ingestion d'aluminium, que l'on retrouve dans notre alimentation quotidienne, induit également des phénomènes d'hypersensibilité viscérale. Du fait de la complexité des mécanismes impliqués dans la nociception, aucun traitement efficace n'existe. Le but de ces études est donc d'évaluer l'efficacité thérapeutique de composés de synthèse (médicaments « candidats ») mais également de micro-organismes ou de stratégies nutritionnelles ou encore de chélateurs de métaux à visée détoxifiante. Ces évaluations précliniques n'interviennent toutefois qu'après une caractérisation et une sélection préalable rigoureuse des effets analgésiques et/ou anti-inflammatoires, modificateurs de la flore, chélateurs de métaux, permettant de moduler la motricité musculaire de l'intestin. Ces composés seront ensuite testés afin de limiter au mieux le nombre d'animaux (Réduire). Il n'est cependant pas possible de modéliser *in vitro* un processus aussi complexe que celui de la sensibilité viscérale qui fait intervenir le système nerveux entérique et d'autres composantes du tissu intestinal ainsi que de nombreux types cellulaires comme les cellules entérochromaffines, les mastocytes, les éosinophiles. De plus, les stratégies nutritionnelles nécessitent l'ingestion des composés à tester afin qu'ils agissent au « bon endroit » sur leur cible (Remplacer). Les procédures sont en outre définies au mieux pour offrir le maximum de confiance dans les résultats générés dans le respect du bien-être des animaux en limitant la souffrance animale grâce à des points limites définis en amont (Raffiner).
Le nombre total d'animaux sur les 5 ans à venir est estimé au maximum à 6200 rats en 4 procédures distinctes.

11060 Le but de ce projet d'une durée de 3 ans est d'étudier les effets de 20 ingrédients d'origine végétale administrés par voie orale sur l'anxiété et la dépression chez le rat mâle Wistar Han.
Les troubles anxieux et les troubles liés au stress sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, on estime que 13 à 22% des habitants de ces pays développeront une pathologie anxieuse au cours de leur vie. Par ailleurs, le stress est impliqué dans l'apparition de pathologies d'ordre psychiatrique avec, au-delà de l'aspect individuel, un coût important pour la société. Par exemple, le trouble de l'adaptation avec anxiété est à l'origine d'environ 9% des consultations de médecine générale pour motif psychologique en France.
Au plan des traitements, l'arsenal pharmacologique disponible concernant l'anxiété et le stress présente de nombreuses limitations dues aux effets secondaires importants et/ou à l'efficacité limitée de ces molécules. Dans ce contexte, la recherche de nouveaux produits plus efficaces représente donc un enjeu sociétal et économique majeur. La prévention de l'anxiété et du stress par exemple à l'aide de techniques de relaxation ou par des facteurs nutritionnels semble également une approche alternative prometteuse.
La dépression est un trouble psychiatrique se caractérisant notamment par un sentiment de désespoir et de monotonie, une perte de motivation et de facultés de décision, une anhédonie, des troubles alimentaires et du sommeil, des pensées morbides et une perte de l'estime de soi.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la dépression concerne 300 millions de personnes dans le monde et 800 000 personnes meurent en se suicidant chaque année. D'ici 2020, la dépression deviendra la deuxième cause d'invalidité à travers le monde, après les troubles cardiovasculaires.

Vingt ingrédients d'origine végétale (1 à 20) dont l'innocuité a été prouvée dans des études de Toxicologie effectuées au préalable chez l'animal, sont des candidats potentiels pour être efficaces sur l'anxiété et éventuellement la dépression selon des résultats préliminaires effectués *in vitro*. Pour réaliser ce screening, 5 études seront réalisées, nécessitant chacune 84 rats mâles Wistar Han d'un poids de 200-225 g soit 420 rats pour la réalisation de ce projet dans sa totalité, avec 12 rats par groupe de traitement répartis comme suit pour chaque étude réalisée :

- Groupe 1 : Véhicule,
- Groupe 2 : Véhicule puis référence pour l'anxiété,
- Groupe 3 : Véhicule puis référence pour la dépression,
- Groupe 4 : Ingrédient d'origine végétale 1,
- Groupe 5 : Ingrédient d'origine végétale 2,
- Groupe 6 : Ingrédient d'origine végétale 3,
- Groupe 7 : Ingrédient d'origine végétale 4.

Les doses d'ingrédients végétaux testés seront définies pour chaque étude.

Les animaux seront placés à 3 par cage (cages ouvertes de 1300 cm² de surface, 18 cm de hauteur) dans une animalerie climatisée, à une température de 22 ± 2°C et une humidité relative de 50 ± 20%, et ils seront soumis à un cycle lumière-obscurité inversé de 12 heures (lumière de 20h00 à 08h00) pour observer leur comportement suite aux traitements effectués pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des briques d'Aspen, seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement). Ils auront accès à un régime standard et à l'eau fournis *ad libitum*.

L'expérimentation débutera après une période d'acclimatation d'une semaine des animaux aux conditions du laboratoire.

Les animaux seront pesés 3 jours avant le début des traitements afin de les répartir de façon homogène dans les 7 groupes de traitement selon leur poids. Ils recevront les ingrédients à tester par voie orale pendant 3 semaines avant la réalisation d'un test comportemental permettant d'observer leur activité générale (Open Field = OF1) suivi d'un test comportemental spécifique permettant de mesurer le niveau d'anxiété des animaux (labyrinthe en croix surélevé (LCS)). Une semaine supplémentaire de traitement sera effectuée avant la réalisation d'un second test comportemental afin d'observer leur activité générale (Open Field = OF2) suivi d'un test comportemental spécifique permettant de mesurer le niveau de dépression des animaux (test de désespoir comportemental = TDC). Les prises alimentaire et hydrique ainsi que le poids des animaux seront relevés deux fois par semaine. Ils seront pesés de nouveau avant chaque test comportemental effectué.

Les tests comportementaux seront effectués après 21 ou 28 jours, après traitement oral (Procédure 1) : OF1 et OF2 (Procédure 2) de 5 minutes suivis du LCS pendant 5 minutes également (Procédure 3), et du TDC à J27 et J28 (Procédure 4). Les animaux seront mis à mort à l'issue du dernier test comportemental (TDC) à J28.

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation, et si des modifications de leur comportement sont observés (agressivité, cachexie, vocalises...), ou s'ils perdent trop de poids (plus de 20% par rapport à leur poids maximum atteint au cours de l'étude), ils seront mis à mort dans des conditions éthiques.

Ce projet est réalisé sur des animaux vivants car il n'est pas possible d'utiliser des modèles *in vitro* pour évaluer les effets sur l'anxiété et sur la dépression de substances (Remplacement), mais nous utiliserons le nombre d'animaux minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats représentatifs, reproductibles et significatifs (Réduction).

11061 Le virus de l'hépatite E (VHE) est un pathogène zoonotique émergent et la cause majeure d'hépatite entéro-transmissible dans le monde. 4 génotypes d'hépatite sont capables d'infecter l'homme. Les génotypes 3 et 4 se transmettent de certaines espèces animales à l'homme alors que les 2 autres infectent seulement les humains. Cette différence soulève des interrogations sur les déterminants associés au franchissement de la barrière d'espèce par le VHE. Les porcs domestiques sont le réservoir principal de l'hépatite et le virus se transmet par contact direct avec les porcs infectés ou par la consommation de viandes infectées. Etant largement enzootique dans les élevages de porcs, il représente un problème majeur pour la santé publique et la sécurité alimentaire. Lors d'une infection virale, une cytokine est sécrétée par l'hôte, l'interféron, qui active des voies de signalisation cellulaires. Cette réponse de l'hôte permet de lutter précocement contre les infections virales et varie en fonction du virus et de l'hôte impliqués. Dans ce projet, nous avons pour objectif d'identifier et de caractériser la voie de signalisation cellulaire exprimée en fonction du génotype impliqué (génotype 1 vs génotype 3) et de l'espèce infectée (humain vs porcin). Pour réaliser ceci, des essais de analyses moléculaires quantitatives seront utilisés pour détecter l'expression de centaines de gènes humains et porcins dans des hépatocytes infectés ou non *in vitro* avec VHE de génotypes 1 et 3 et dans le foie de porcs infectés expérimentalement avec VHE de génotype 3 en comparaison à de porcs témoins (N = 18 : 9 porcs infectés et 9 porcs témoins). Les expérimentations conduites seront faites dans le respect de l'éthique et du bien-être des animaux. Nous évaluerons ensuite l'activité antivirale des protéines codées par les ISGs identifiés et déterminerons si ceux-ci sont conservés entre espèces d'hôtes et sont effectifs contre les génotypes du VHE se transmettant de certaines espèces animales à l'homme et ceux strictement humains. Ceci nous permettra de mieux comprendre les facteurs de l'hôte et du virus qui contribuent au passage de la barrière d'espèce du VHE.

Remplacement : L'infection par le VHE étant difficile à modéliser, *in vitro*, le modèle animal est indispensable en vue d'une comparaison avec les données obtenues chez l'Homme.

Réduction : Ce projet permettra de déterminer la physiopathologie de l'infection par le VHE-3 chez le porc afin d'identifier des molécules antivirales cellulaires impliquées dans la transmission chez les deux espèces. Le nombre d'animaux par lot est basé sur les résultats des expérimentations préliminaires déjà réalisées et sera le plus faible possible tout en permettant l'obtention de résultats exploitables statistiquement.

Raffinement : Il y aura un enrichissement social (hébergement en groupes/visites journalières) et environnemental (ballons, chaînes). La maladie est asymptomatique chez le porc.

11062 Le cancer gastrique est le troisième cancer le plus meurtrier dans le monde. Ce type de cancer est de très mauvais pronostic du fait notamment de l'absence de thérapies spécifiques. La prise en charge est basée uniquement sur de la chirurgie associée à des cures de chimiothérapies. Il est donc nécessaire de développer des traitements plus spécifiques, plus efficaces et moins toxiques pour le patient.

Dans cette optique nous voulons tester l'efficacité de plusieurs molécules qui agissent sur une sous-population de cellules cancéreuses à l'origine du développement de ces cancers. Nous allons tester un ensemble de molécules déjà utilisées en médecine humaine pour d'autres applications mais pas dans les cancers gastriques.

Il nous est impossible de remplacer les expériences menées *in vivo* par des études *in vitro* ou *in silico* car notre étude sur les cancers gastriques fait intervenir de nombreuses molécules et cellules et il est impossible de modéliser ces différents acteurs *in vitro*.

Dans le but de restreindre le nombre d'animaux, nous utiliserons des tests statistiques adaptés et nous combinerons les lots témoins. Dans le but de raffiner nos expériences, la douleur animale sera prise en compte de la naissance à la mort des souris. Nous demandons pour l'ensemble de l'étude 2540 animaux sur les 5 prochaines années.

11063 Les récepteurs adénosinergiques A2A, cibles des effets de la caféine, ont un potentiel thérapeutique important dans le contexte des maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer). Nous

développons de nouvelles molécules antagonistes dont nous souhaitons évaluer 1) la biodisponibilité cérébrale après administration chronique orale et 2) les effets biologiques sur la motricité, caractéristique de cette classe de molécule. La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole : 1) Raffinement : dans tous les protocoles, l'ensemble des procédures expérimentales sera réalisé en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux utilisés par la mise en place de période d'accoutumance et l'emploi d'anesthésiant et antalgique adaptés. Les animaux seront hébergés avec un enrichissement du milieu. L'évaluation de la souffrance sera basée sur un suivi quotidien (attitude corporelle, aspect du pelage, poids corporel) de sorte à administrer un traitement anti-inflammatoire/antalgique supplémentaire, ou sortir un animal de l'étude en cas d'atteinte des points limites établis. 2) Réduction : Pour chacun des groupes constitués, le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisant (différences statistiquement observables). 3) Remplacement : L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets pharmacologiques de nouveaux modulateurs de récepteurs cérébraux. L'utilisation d'animaux vivants revêt donc un caractère de stricte nécessité. Le nombre total d'animaux concernant de dossier sur les 3 ans à venir est estimé à 320 souris C57Bl6/J males. Cette utilisation maximise les données obtenues de chaque animal, ce qui peut limiter ou éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Les animaux seront suivis précisément pour chaque protocole, pour lesquels des points limites adaptés ont été définis. Toute souffrance, angoisse ou comportement inhabituel sera pris en charge par des approches appropriées. Les animaux présentant un des points limites spécifié pour chaque approche expérimentale sera sacrifié dans une salle dédiée ; le tout en lien avec le responsable du bien-être animal.

11064 Nous cherchons à caractériser la biodiversité des petits mammifères non-volants vivant sur le domaine d'un Zoo. Pour ce faire, nous échantillonnerons en diverses localités du zoo (80 hectares) et en différents milieux (forêt de garrigue ; forêt de bord de rivière ; prairie et bosquets en prairie). Nous répèterons certains échantillonnages à deux reprises (différentes saisons) dans l'année, et prolongerons notre étude durant 3 à 4 ans, afin de mieux cerner les fluctuations d'abondance des mulots, musaraignes, et autres souris sauvages.

La stratégie d'observation (piégeages dans les bosquets forestiers) sera conduite afin de réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées.

Les animaux seront capturés par des pièges-cages contenant une abondante litière ainsi que de la nourriture ad-libitum ; ces cages seront vérifiées matin et soir pour diminuer au mieux l'inconfort.

Les animaux (effectif total estimé entre 200 et 500 individus) seront capturés par des pièges-cages, marqués individuellement, et relâchés immédiatement sur place. Une session de piégeage durera dix jours consécutifs, mais pourra être raccourcie dès qu'aucun nouvel animal ne sera capturé durant 2 nuits consécutives.

L'analyse des données (les piégeages seront standardisés pour permettre des comparaisons valides) nous renseignera sur l'abondance, la distribution des âges, le sex-ratio, les fluctuations intersaisons et interannuelles, des espèces rencontrées.

11065 Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacologie, de la toxicologie et de l'efficacité thérapeutique. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament. Ce projet a pour but d'étudier l'effet de différents traitements sur la douleur induite dans un modèle de neuropathie induite par un anti-cancéreux chez la souris ou chez le rat. Le développement de molécules analgésiques et antalgiques pour traiter les douleurs neuropathiques associée à la prise d'anti-cancéreux est particulièrement important pour le confort des patients traités par chimiothérapie.

Pour nos études, nous utiliserons deux modèles d'évaluation de la douleur chez la souris ou le rat. Le premier est le test de Von Frey qui permet de mesurer la douleur mécanique par l'application de filaments de diamètre croissant sur la patte de l'animal. Le second est le test de plaque chaude/froide qui permet de mesurer la sensibilité thermique de l'animal en plaçant l'animal successivement sur une plaque froide et chaude et en mesurant son temps de réaction.

Nos études permettront d'évaluer l'action de médicaments sur la douleur neuropathique induite par la chimiothérapie. Pour ce projet nous pensons effectuer 15 études avec pour chaque étude, l'utilisation de 40 souris ou rats (5 groupes de 8 animaux par groupe), soit 600 animaux sur 5 ans.

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

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

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

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

Les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée afin de détecter les points limites de douleur. Les expériences seront effectuées sur des temps très courts (jusqu'à 15 minutes) afin de limiter le temps de souffrance des animaux. Pour les injections intraveineuses répétées, un suivi sera réalisé afin de détecter toute contre-indication éventuelle (queue abimée, veine collapsée...). Le cas échéant, l'injection intraveineuse sera remplacée par une injection intrapéritonéale.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Notre projet se focalise sur un modèle expérimental nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

11066 L'Imagerie par résonance magnétique (IRM) fait partie des techniques d'imageries médicales modernes. Elle est apparue vers les années 1970 mais n'a pris un véritable essor pour le diagnostic médical que depuis une quinzaine d'années. Elle permet de visualiser les tissus mous, avec une précision d'autant plus grande que le champ magnétique utilisé est puissant. Dans les années 1990, l'utilisation de la différence de signal émis par les hémoglobines oxygénées ou désoxygénées a permis de voir l'activité des tissus mous en fonction de leur consommation d'oxygène créant ainsi l'IRM fonctionnelle. Puis l'arrivée des produits de contraste utilisant par exemple des complexes incluant du gadolinium ou des sels de manganèse ont fait de l'IRM un véritable outil dynamique pour la neurophysiologie ou la neuropathologie. Au niveau du cerveau, les approches IRM présentent également un intérêt sur le plan de la recherche en physiologie et pour les diagnostics médicaux. Les chauffeurs de taxis londoniens qui ont une mémoire extraordinaire des rues de Londres disposent d'un hippocampe, structure siège de la mémoire de l'espace, très développé. Chez l'être humain, des troubles de stress post-traumatiques consécutifs à des stress extrêmes sont également susceptibles de laisser des traces visibles au niveau encéphalique. En pathologie humaine, l'IRM, en raison de son aspect quasi non invasif, peut être utilisée sans problème sur les bébés notamment après une hypoxie prolongée et est devenue l'outil de référence pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

En médecine équine, l'utilisation de l'IRM s'est fortement développée pour le diagnostic des boiteries. L'IRM du cerveau de cheval n'a été utilisée que dans quelques cas pathologiques. A ce jour, dans la base Pub-Med aucun auteur ne s'est intéressé à l'IRM du cerveau de cheval à des fins de physiologie. L'IRM permettrait pourtant de comprendre certaines questions biologiques spécifiques aux chevaux comme, par exemple, celles liés à la saison (reproduction, homéothermie...) au comportement d'apprentissage, à l'effet de l'entraînement sportif, ou encore au stress et au mal être et par la suite de bien identifier certains troubles cliniques. Maintenant, la principale raison de cette absence d'utilisation de l'IRM sur le cerveau de cheval est liée à l'absence d'images moyennes de référence encore appelées « Template ». Notre objectif est donc de créer ce « template », une carte en 3 dimensions du cerveau de jument.

Depuis mars 2013, nous disposons d'une IRM utilisant un champ magnétique de 3T, ce qui assure une très grande qualité d'image au niveau du cerveau. La taille de notre appareil en particulier de la taille de la table et de l'anneau est suffisante pour accueillir des chevaux de petite taille et donc nous avons choisi des animaux de race poneys Welsh. En 2014, nous avons pu faire des essais sur des têtes prélevées à l'abattoir. Malheureusement, sur ces pièces d'abattoir, l'onde de choc induite par l'usage du matador détruit les structures. Nous avons également essayé de récupérer des têtes après euthanasie par des vétérinaires praticiens ; malheureusement cela n'a pas abouti. De plus le tissu nerveux se dégrade très rapidement après la mort et pour ce travail les temps de transports sont rédhibitoires. D'où notre choix de travailler sur l'animal vivant anesthésié. A notre connaissance il s'agit de la première étude sur chevaux. Pour cette première étude et au vu des résultats acquis sur les ovins, 8 juments de race poney semblent suffisantes.

La règle des 3 R sera appliquée à ce protocole de la manière suivante.

Remplacement : aucune méthode substitutive ne permet de se passer de l'expérimentation animale et de restituer la complexité anatomique du cerveau de cheval. De plus le « Template » informatique obtenu permettra dans l'avenir de limiter le nombre de dissection de cerveau et donc d'euthanasie.

Raffinement : l'utilisation d'approches d'IRM nous permettra d'éviter le sacrifice des animaux qui pourront réintégrer, à la fin de l'étude, le troupeau expérimental de l'unité. Avant et après l'acquisition d'image, les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec foin et paille.

Réduction : le nombre d'animaux utilisés est réduit au plus juste en prenant en compte les contraintes des techniques d'imagerie et en prenant en compte la variabilité observée lors d'une expérience précédente sur les ovins.

11067 Les mammifères sont caractérisés par une forte asymétrie des phénotypes mâles et femelles aux niveaux morphologiques, physiologiques et comportementaux, notamment illustrée par des coûts de la reproduction différente entre mâles et femelles. Ce dimorphisme sexuel pourrait s'étendre aux capacités de résilience face au stress environnemental, rendant mâles et femelles inégaux face aux contraintes de leur milieu. Pour explorer cette hypothèse, nous proposons d'étudier l'effet du sexe sur la flexibilité métabolique chez une espèce de primate non-humain vivant en région tropicale. Cette espèce présente la particularité d'exprimer un phénotype saisonnier extrêmement marqué adapté aux variations fortes des conditions de son environnement, avec des périodes hivernales de disette alimentaire. L'adaptation de cette espèce à son environnement se traduit notamment par des variations annuelles de poids très fortes. La perte de poids s'explique par les coûts induits par la reproduction, chez le mâle comme chez la femelle, ces coûts n'étant pas synchrones entre les deux sexes. En effet, la recrudescence des organes sexuels intervient en fin d'hiver chez le mâle et s'accompagne d'une augmentation forte du métabolisme et de l'activité locomotrice, alors que la prise alimentaire est réduite. Le mâle aborde donc la saison de reproduction en ayant consommé la quasi-totalité de ses réserves énergétiques. A contrario, les femelles préservent leurs réserves graisseuses pendant tout l'hiver et ne commenceront à perdre du poids que pendant la gestation et la lactation qui ont lieu pendant l'été. Ce décalage dans le temps de l'utilisation des réserves graisseuses pourrait conférer aux femelles des capacités de résistance au stress accrues pendant l'été. Des études ont d'ailleurs montré que les femelles de cette espèce sont capables, même en été, d'exprimer la torpeur, un mécanisme très efficace d'économie d'énergie. Les mâles ne semblent pas avoir les mêmes capacités, ce qui pose la question de leur vulnérabilité pendant une saison où la prévalence d'événements climatiques imprévisibles ne fait qu'augmenter dans les régions tropicales. Cependant, un éventuel effet du sexe sur les limites des capacités de résilience face à un stress environnemental pendant la saison estivale n'a jamais été démontré.

Dans notre étude, les animaux, mâles et femelles, seront suivis aux deux périodes clés associées aux coûts de la reproduction : la fin de l'hiver pour les mâles et l'été pour les femelles. Cette étude sera réalisée en comparant les réponses d'animaux maintenus en conditions standards et d'autres soumis à un stress calorique chronique afin d'estimer les capacités de résilience des individus. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré une corrélation positive entre activité métabolique, stress oxydatif et senescence génomique ce qui sous-entend que la capacité à ajuster son activité métabolique face à une contrainte environnementale forte serait un moyen efficace de limiter la

dégradation de son matériel génétique. Au cours de ce projet, nous tenterons de répondre à plusieurs questions :

1) Quelles sont les conséquences d'une exposition chronique (6 mois) à une restriction calorique modérée (40%) pendant la phase de repos métabolique (hiver) sur le compromis entre balance énergétique et succès reproducteur ; est-ce que cela affecte l'équilibre oxydatif et l'intégrité génomique ; les réponses différentes elles entre mâles et femelles ?

2) Quels sont les effets d'un stress calorique court mais intense (2 semaines à 60 ou 80% de restriction calorique) effectué pendant les périodes associées aux coûts de la reproduction chez cette espèce sur le compromis entre homéostasie métabolique, succès reproducteur et intégrité génomique.

3) Peut-on estimer les coûts métaboliques et génomiques réels associés à la reproduction chez cette espèce ?

Une combinaison d'approches longitudinales et transversales sera mise en place afin d'estimer les coûts physiologiques associés à la réponse à la restriction calorique, avec une analyse approfondie des différences entre mâles et femelles. Différents paramètres métaboliques (balance énergétique, température corporelle, activité locomotrice), ainsi que des marqueurs de stress de l'organisme (cortisol) et d'efficacité de la réponse au stress (stress oxydatif, machinerie anti-oxydante et longueur des télomères) seront mesurés. Afin de répondre à l'exigence de réduction du nombre d'animaux mais assurer tout de même un pouvoir statistique suffisant pour les effets attendus, ces procédures expérimentales seront réalisées sur un nombre maximal de 6 animaux adultes par groupe expérimental. Au total, nous estimons le nombre maximal d'animaux utilisés à 144 sur 5 ans pour répondre à l'ensemble des questions du projet. Le but de cette étude étant de caractériser aux plans intégratifs et moléculaires les modifications physiologiques et génomiques en réponse à un stress environnemental, une grande attention sera portée au maintien des conditions optimales pour le bien-être des animaux en essayant d'être le moins intrusif possible. L'indicateur privilégié pour le suivi du bon rétablissement de l'animal après application des procédures expérimentales sera les variations anormales de masse corporelle. Dans le contexte saisonnier, les variations de poids peuvent aller jusqu'à 10% en une semaine. Une perte de poids sera considérée comme pathologique à partir du moment où ce seuil sera dépassé. Ce critère sera pris en compte avec d'autres critères comme la prostration, l'état de forme général de l'animal (réactivité, agressivité, etc.). Enfin, un maximum d'attention sera également apporté à la maîtrise des techniques utilisées ainsi qu'à l'utilisation combinée d'anesthésiques (généraux ou locaux) et d'analgésiques pendant et après les procédures expérimentales afin de limiter au mieux le stress et la douleur chez les animaux.

11068 L'immunothérapie représente un nouveau paradigme dans le traitement du cancer, qui consiste à réactiver la réponse immunitaire des patients contre les cellules cancéreuses. Les inhibiteurs des points de contrôle immunitaires (anticorps monoclonaux anti-PD1, anti-PDL1 et anti-CTLA4) ont démontré leur efficacité en réduisant la mortalité de certains cancers agressifs comme le mélanome, le cancer pulmonaire non à petites cellules ou le cancer du rein. Ainsi, de plus en plus de patients vont bénéficier à l'avenir de cette nouvelle stratégie thérapeutique. Cependant, plusieurs cas de toxicité cardiaque ont été rapportés. Il s'agit de cas de myocardites fulminantes ou subaiguës conduisant à des épisodes d'insuffisance cardiaque aiguë ainsi que de troubles du rythme ou de conduction graves. Plusieurs alertes de sécurité ont récemment été émises depuis la mise sur le marché de ces molécules mais les mécanismes physiopathologiques des effets indésirables cardiovasculaires restent mal connus ainsi que leurs facteurs prédictifs.

Nous proposons de mettre en place un modèle d'étude de la cardiotoxicité induite par les immunothérapies anti-cancéreuse de type PD-1/CTLA4. Nous faisons le choix d'utiliser le modèle souris, qui présente des caractéristiques immunitaire et cardiovasculaire proches de celles de l'homme, afin d'étudier le développement de la toxicité cardiaque induite par ces molécules. Différents groupes de souris seront étudiés : des souris de type BALB/c saines et inflammées après injection de LPS (lipopolysaccharide), dans lesquelles les anticorps seront injectés en intrapéritonéal. Nous faisons le choix, dans l'établissement de ce modèle, d'utiliser le LPS afin

d'induire un état inflammatoire également rencontré lors du développement des tumeurs, et de ne pas utiliser d'animaux atteints de tumeurs. Ce modèle n'ayant jamais été décrit, il est important dans un premier temps pour nous d'établir les conditions qui permettront d'étudier le développement de la cardiotoxicité sans avoir à gérer le développement tumoral en parallèle. Nous rechercherons les processus biologiques dérégulés au cours de la toxicité cardiaque au niveau de l'organisme entier (ECG, IRM, biomarqueurs sanguins), des tissus cardiaques (immunologie) ainsi qu'au niveau moléculaire (transcriptome, western blot).

Ce projet s'intègre dans la thématique émergente de la cardio-oncologie et devrait nous permettre de caractériser la toxicité cardiaque induite par ce traitement d'immunothérapie : en particulier, le pourcentage d'individus présentant une toxicité, le type de dysfonction cardiaque qu'elle induit, les gènes et protéines impliqués dans ces défauts cardiaques, les relations entre cellules inflammatoires et cellules cardiaques.

Ce travail mené chez la souris sera confronté aux études cliniques réalisées dans notre groupe chez des patients cancéreux traités par les mêmes molécules, anti-PD1 et anti-CTLA4, et présentant des signes de toxicité cardiaque. Ces travaux apporteront une meilleure compréhension des mécanismes liés à la toxicité cardiovasculaire afin d'améliorer les thérapies de cardioprotection pour les patients traités pour un cancer et pourraient permettre d'ouvrir de nouvelles perspectives dans le traitement des maladies cardiovasculaire en utilisant des voies de l'immunité.

Le nombre d'animaux (183 souris) a été calculé et maintenu minimal tout en générant le maximum d'information exploitable scientifiquement. Les points limites attendus sont la défaillance cardiaque et tout signe de détresse/souffrance lié au développement de cette défaillance et à l'inflammation induite. Cependant, la nature des expériences conduites (administrations intrapéritonéales, imagerie et ECG non invasifs sous anesthésie) ne devraient pas entraîner de douleurs particulières.

11069 Contexte.

La technologie des ultrasons focalisés, connue par l'acronyme HIFU, permet d'effectuer l'ablation de tissus pathologiques d'une manière non-invasive. Une sonde émet des ultrasons qui traversent la peau et se concentrent sur le tissu à traiter, provoquant sa coagulation. La sonde comporte aussi une barrette d'échographie qui permet de guider en permanence le geste. Les HIFU sont déjà utilisés en routine pour traiter notamment les cancers de la prostate et les fibromes utérins. De nombreuses autres applications cliniques sont en développement. Nous envisageons de traiter de cette façon les varices.

Cette technologie permet de remplacer les techniques chirurgicales ou les méthodes endoveineuses (laser, radiofréquence.) par un geste totalement non invasif. Les avantages comparatifs du dispositif concernent aussi bien le patient, les praticiens et les centres de traitement que la collectivité. Pour le patient, les avantages se traduisent par une absence d'hospitalisation (acte ambulatoire) et par l'amélioration de la qualité de vie post opératoire (absence de cicatrice, douleurs moindres...). Pour les praticiens et les centres de traitement, les avantages se caractérisent par l'augmentation du nombre de patients traités, la possibilité d'adresser différentes pathologies via un dispositif unique et la sécurité, l'efficacité et la facilité d'utilisation. Pour la collectivité, les avantages comparatifs sont d'ordre économique et se traduisent notamment par la réduction des coûts induits par les traitements médicamenteux longs ou les actes chirurgicaux (salle d'opération, coûts liés à l'hospitalisation).

Objectif général.

Valider l'efficacité et la sécurité d'un nouveau mode d'action de notre dispositif de traitement HIFU pour la coagulation des veines dans le contexte du traitement des varices.

Modèle animal et méthode :

Des traitements HIFU seront délivrés sur les saphènes médiales de six brebis. Ce modèle est pertinent pour atteindre l'objectif de ce projet. Sa localisation la rend accessible avec le dispositif de traitement HIFU et il est nécessaire de traverser des tissus superficiels. Les preuves obtenues sur ce modèle nous ont déjà permis de justifier un essai clinique en 2017 avec le mode d'action actuel

du dispositif. Les brebis seront séparées en deux groupes de trois individus. Seule la durée de suivi différera selon les groupes : elle sera respectivement de 30 jours et 90 jours.

Les brebis seront anesthésiées et on appliquera l'énergie HIFU sur une saphène par voie externe en utilisant des pulses courts et de forte puissance à une fréquence ultrasonore plus faible qu'actuellement. Après traitement, les brebis seront réveillées et placées sous analgésique. Un examen visuel (ne nécessitant pas d'anesthésie) sera effectué à D1, D7, D14, D21, D30 et D45, D60, D75, D90, selon la durée de suivi. Les critères évalués seront notamment l'aspect du site traité (absence d'hématome) et la manière dont la brebis se sert de sa patte. A la fin du suivi, les brebis seront anesthésiées et un examen échographique de chaque patte traitée sera réalisé. Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés, des traitements similaires à ceux délivrés sur la saphène médiale pourront être réalisés lors de l'anesthésie pré-sacrifice sur la saphène latérale afin d'acquérir des données complémentaires en aigu. Ces traitements supplémentaires sont sans impact sur le bien-être de l'animal et ne remettent pas en cause la qualité des données collectées avec suivi distant car la saphène latérale est située sur la face latérale de la patte, loin du site médial. Les brebis seront ensuite sacrifiées. Les veines traitées ainsi que des portions de muscles situées en regard de la veine seront prélevées et envoyées pour analyse histologique. Les durées de suivi sont justifiées d'une part par la nécessité de réaliser un suivi clinique pour faire la preuve qu'aucune complication n'a lieu, et d'autre part par la nature des phénomènes à observer en histologie. Le pic de dommages est attendu à 30 jours (occlusion.), le processus de guérison par fibrose doit être résolu à 90 jours.

11070 En 2012, les maladies cardiovasculaires causèrent 17.5 millions de décès à travers le monde (Data OMS), soit 30% de la mortalité. Selon les estimations, 7,5 millions de ces décès sont dus aux cardiopathies coronariennes (notamment l'infarctus du myocarde). Selon l'OMS, d'ici 2030, près de 23,6 millions de personnes mourront de maladies cardiovasculaires, principalement de cardiopathies et d'accidents vasculaires cérébraux. Selon les projections, ces affections resteront la première des causes de mortalité. Ce morbide fardeau persiste car le besoin médical cardiovasculaire n'est pas intégralement couvert par les thérapeutiques disponibles à ce jour, de nouvelles approches sont nécessaires. Un nouveau composé (peptide modulateur de l'inflammation) prometteur dans le traitement de l'infarctus du myocarde a été développé.

L'infarctus du myocarde est un syndrome clinique complexe qui résulte d'une ischémie myocardique. Ce dernier est un processus dynamique à l'origine de lésions cellulaires et moléculaires d'ampleur variable selon la taille, la durée et la sévérité de l'épisode ischémique. Ceci est généralement causé par une occlusion de l'artère coronaire, entraînant un déséquilibre entre l'apport et la demande en oxygène. Il est ainsi possible de distinguer les ischémies dites de courtes durées, responsables de lésions myocardiques ischémiques réversibles, des ischémies prolongées dont les lésions sont irréversibles. En effet, en deçà d'une quinzaine de minutes d'ischémie, les dommages cellulaires sont considérés comme totalement réversibles, puisque la reperfusion coronaire permet de rétablir un métabolisme et une fonction normale, sans apparition de nécrose cardiomyocytaire. A l'inverse, si l'ischémie est prolongée au-delà de 15-20 minutes, une partie du tissu myocardique peut être irréversiblement lésé et maintenue par une réaction inflammatoire importante. En effet, l'infarctus est associé à une réaction inflammatoire, condition préalable à la cicatrisation. Cette réponse est amplifiée en termes d'amplitude et de durée lorsque le tissu ischémique est reperfusé.

Un des acteurs essentiels au développement de cette réponse inflammatoire est le Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 (TREM-1). TREM-1 est une protéine présente à la surface des leucocytes et d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales et les fibroblastes). Il joue un rôle important dans l'amplification de la réponse inflammatoire en synergie avec les Toll-Like-Receptor (TLR). Malgré une physiopathologie de mieux en mieux connue et une bonne prise en charge des patients atteints d'infarctus du myocarde, aucun traitement spécifique n'a à ce jour fait la preuve définitive de son efficacité. Plusieurs travaux précliniques publiés récemment concernant l'utilisation d'un immunomodulateur (inhibiteur de TREM-1) au cours de l'infarctus du myocarde ont clairement montré une amélioration de la survie, une diminution de la taille d'infarctus

et une modulation de la réponse inflammatoire. Cette étude a pour objectif d'évaluer la dose efficace pendant la plus courte durée possible afin de limiter le nombre d'injections successives et le stress associé et de se rapprocher du schéma thérapeutique clinique.

Dans cette étude, nous administrerons deux doses de cet immunomodulateur dans un modèle d'infarctus du myocarde par une ligature permanente ou transitoire de l'artère coronaire chez la souris et le rat afin de mesurer l'efficacité du peptide en fonction de la dose administrée et la durée du traitement. Pour ce faire, plusieurs approches seront utilisées à savoir (survie, taille de l'infarctus, la fonction cardiaque, définition des profils inflammatoires leucocytaires, biomarqueurs). Ce projet nécessite des procédures expérimentales sur des animaux vivants, plus particulièrement la souris et le rat. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire *ex vivo* du fait de sa complexité. Par ailleurs, le modèle d'ischémie permanente ou transitoire de l'artère coronaire utilisé a été développé chez le rat et la souris pour permettre ce type d'étude.

Le nombre total des animaux utilisés dans ce projet est estimé à 246 souris et 246 rats adultes. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

L'ensemble des animaux dispose d'un enrichissement dans leur cage. Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie afin de s'assurer du bien-être de l'animal.

Enfin, l'utilisation d'animaux est rendue nécessaire par l'absence de modèle *in vitro* ou de possibilité de modélisation *in silico*. Nous avons veillé à réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaire tout en garantissant une puissance statistique suffisante. Enfin, les animaux seront hébergés en portoir avec des cages ventilées et filtrées, à 5 souris par cage, dans des cages de 500 cm², à 2 rats par cage, dans des cages de 900 cm². Les cages seront enrichies à la base de tunnel de polycarbonate et/ou buchettes en peuplier.

11071 Ce projet de recherche a pour principal but la compréhension du lien entre les infections à entérovirus et le développement du diabète de type 1. Cette étude vise donc à évaluer dans quelle mesure l'infection pourrait favoriser le développement de la maladie. Cette étude va durer 5 ans nécessiter l'utilisation de 85 souris. Les mesures suivantes seront mises en place afin de respecter la règle des 3R.

- Remplacer : cette étude chez l'animal constitue la dernière étape de ce projet de recherche. Elle ne peut malheureusement pas être remplacée par une méthode *in vitro* car elle met en œuvre plusieurs mécanismes physiologiques impossibles à reproduire *in vitro*. Les premières étapes du projet ont été cependant réalisées *in vitro*, ce qui a permis d'éviter des tests préliminaires sur l'animal.

- Réduire : notre protocole prévoit un nombre d'animaux minimum et suffisant afin de limiter autant que possible leur utilisation et, en même temps, permettre une analyse statistique significative des résultats. Il est également prévu d'assurer un suivi régulier des animaux afin de recueillir un maximum d'information et éviter ainsi la répétition inutile de l'expérience.

- Le Raffinement : afin de diminuer les contraintes, le stress et la douleur, il n'est prévu qu'un nombre limité d'inoculations du produit à tester. Les manipulations se feront à distance des autres animaux et un suivi régulier de l'état général, du poids et de la glycémie sera effectué afin de détecter, de façon précoce, les animaux qui manifesteraient des signes de souffrance et d'y remédier. Les conditions d'hébergement des animaux seront également améliorées en assurant un enrichissement optimal de leur environnement.

Les différentes informations issues de cette étude permettront le développement de médicaments pour soigner ou prévenir la maladie.

11072 Les maladies transmises par les insectes sont parmi les principales causes de mortalité dans le monde. L'amélioration des connaissances sur le rôle des insectes qui transmettent les agents pathogènes d'un hôte à un autre est nécessaire. La lutte chimique est par ailleurs souvent le seul

moyen de prévention contre ces maladies : Aussi l'étude de la résistance des moustiques aux insecticides est-elle d'un intérêt primordial. Ce projet s'intéresse aux moustiques qui transmettent des maladies comme le paludisme, la dengue, le chikungunya ou le zika. Les travaux sont menés au sein d'une plateforme scientifique adaptée, comprenant des insectariums pour l'élevage des moustiques, un laboratoire de sécurité biologique pour l'infection artificielle des moustiques, et des installations pour l'hébergement des animaux de laboratoire.

Les travaux nécessitent le maintien de différentes souches de moustiques passant par la production régulière d'œufs. Cette production d'œufs n'est possible que si les moustiques femelles ont pris au préalable un repas de sang frais. La souris apparait comme une source de sang frais pertinente. L'utilisation d'autres sources (poches de sang par exemple) ne permet pas d'obtenir une production d'œufs satisfaisante. Les souris sont anesthésiées avant d'être exposées, au maximum durant 30 minutes, aux piqûres des moustiques. Le nombre de souris placées dans les cages est fonction du nombre de moustiques femelles (une souris pour 100 moustiques femelles). Une même souris n'est utilisée qu'une fois par semaine. Au total, 1200 souris seront utilisées sur la durée du projet. Les mêmes souris seront utilisées pendant deux mois puis mises à mort. Le bénéfice attendu de l'utilisation de souris est la production de pontes de qualité permettant de maintenir les élevages de moustiques, mais tout est mis en œuvre pour limiter le nombre de souris, le stress et la douleur du gorgement.

L'étude de l'efficacité des moustiques comme vecteurs de maladies repose sur la compréhension de leur infection, du développement de l'agent pathogène dans leur corps et de leur capacité à transmettre le virus. Pour étudier cette « compétence vectorielle », les moustiques sont infectés à l'aide d'un dispositif de gorgement sur membrane leur permettant de prendre un repas de sang frais. Les lapins sont utilisés comme source de sang frais. Ils sont prélevés à l'oreille et le sang est ensuite artificiellement infecté avec l'agent pathogène à étudier avant d'être proposé aux moustiques. La quantité de sang prélevée, environ 15 ml, correspond à ce qui peut être supporté par un lapin de taille moyenne, prélevé selon un rythme hebdomadaire. Dans le cadre de cette étude, trois lapins seront hébergés, et au maximum, trois expérimentations seront programmées chaque semaine : chaque lapin ne sera prélevé qu'au maximum une fois par semaine. Au total, 15 lapins seront utilisés sur la durée du projet. Les difficultés d'approvisionnement en poches de sang adapté aux besoins des manipulations pouvant être importantes, les lapins restent la source d'approvisionnement la plus fiable.

Qu'il s'agisse des souris ou des lapins, même si les deux procédures sont de sévérité légère, tout sera mis en œuvre pour minimiser les dommages aux animaux. Une attention permanente sera portée aux animaux en surveillant leurs réactions pendant et à la suite des manipulations. Par ailleurs, une veille technique et technologique constante permettra le cas échéant l'identification d'alternatives à l'utilisation d'animaux.

11073 Nos projets visent à étudier l'efficacité de nouveaux traitements anticancéreux dans des cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) qui présentent soit une insensibilité soit ayant acquis des résistances aux thérapies conventionnelles et indiqués dans ces cancers. Le cancer des voies aérodigestives supérieures est le 5ème cancer le plus fréquent en France et représente la 7ème cause de mortalité par cancer. En France, en 2010, on a estimé 14 000 nouveaux cas de cancers ORL et 5000 décès par an. Le traitement repose sur une chirurgie d'exérèse, lorsqu'elle est possible, associée à la chimiothérapie (cisplatine) et à la radiothérapie (photonthérapie) selon les stades et l'extension.

En plus d'étudier l'efficacité de nouveaux traitements, nous tâcherons de déterminer de nouveaux marqueurs prédictifs de la réponse aux traitements de référence. Nous déterminerons également si ces marqueurs peuvent être considérés comme de nouvelles cibles thérapeutiques.

La procédure 1 a pour but de confirmer que l'inhibition de la « Polo Like Kinase (PLK1) » par un agent pharmacologique, le NMS-P937, ainsi que l'anti-angiogénique cabozantinib, induisent une régression tumorale. Ces expériences ont pour objectif de proposer cette alternative de traitement

aux patients atteints de cancers VADS résistants aux traitements de référence, le cisplatine et la photonthérapie.

D'un point de vue éthique et conformément aux exigences de remplacement, réduction et raffinement, les expériences sur les animaux ont été précédées de nombreuses expériences réalisées sur des lignées cellulaires. Ces mises au point *in vitro* nous permettent de diminuer le nombre d'animaux à utiliser dans les expériences *in vivo*. De plus, une grande importance sera accordée au bien-être des animaux avec un suivi régulier, par un personnel formé à l'expérimentation animale, afin de détecter tout signe de détresse et/ou de souffrance suite à l'injection des cellules en sous cutanée mais aussi suite à l'administration des différents traitements. Aucun effet néfaste des composés n'est attendu étant donné les données de la bibliographie mais aussi par le fait que le cisplatine et le cabozantinib sont des médicaments déjà utilisés en clinique et que le NMS-P937 est en phase 2 d'essai clinique dans les leucémies aiguës myéloïdes.

Nous utiliserons pour ce projet un total de 100 souris. Ces souris sont immunodéficientes ce qui permet de réaliser des xénogreffes de cellules humaines dans un modèle murin sans rejet par le système immunitaire.

En vue de futures applications cliniques qui exigent la démonstration d'efficacité de traitement sur au moins un modèle animal, ces études *in vivo* sont nécessaires et incontournables.

11074 Pour de nombreuses études de pharmacologie, de virologie, thérapie cellulaire ou génique, les modèles murins chimériques pour le foie sont devenus un modèle de choix. Il s'agit de souris immunodéficientes (sans système immunitaire) greffées avec des hépatocytes (cellules du foie) humains. Dans le cas des virus des hépatites humaines, ces virus (responsables des hépatites B ou C par exemple), n'infectent pas les cellules de souris. L'établissement de ce type de modèle humanisé pour le foie permet donc d'étudier ce type d'infection virale humaine. Le métabolisme des cellules hépatiques murines et humaines étant très différents, ce modèle permet donc aussi d'étudier la pharmacocinétique de nouvelles molécules thérapeutiques.

Bien que de nombreuses expériences peuvent être réalisées *in vitro* pour valider des molécules antivirales par exemple, il n'est pas possible de reproduire pour le moment avec des méthodes alternatives les interactions complexes entre le foie, la réponse immunitaire innée, ou encore le microbiote (flore intestinale). Ces modèles chimériques sont donc de très bons supports d'études entre les étapes préliminaires *in vitro* et le développement clinique.

Plusieurs sources cellulaires peuvent être utilisées pour reconstituer un foie chez la souris : notamment des hépatocytes humains issus de pièces de résection opératoire (lors d'une intervention chirurgicale, le patient donne son consentement pour qu'un fragment de foie soit récupéré afin d'en isoler les cellules dans un but de recherche). La disponibilité et la qualité de telles cellules sont des facteurs limitant pour la génération de souris humanisées. Il a été démontré que les cellules hépatiques humaines issues de foie de souris chimériques conservaient leur capacité de régénération : il est donc possible de récupérer les cellules à partir d'un foie de souris humanisée, pour les congeler puis les utiliser pour générer de nouvelles souris chimériques. L'objectif de ce projet est de mettre en place une procédure de « perfusion » de foie sur des animaux anesthésiés pour en récupérer les cellules humaines. Les cellules isolées seront ensuite réinjectées à de nouvelles souris pour valider les préparations cellulaires.

Un certain nombre de lot de cellules sera ainsi généré pour alimenter différents projets de virologie, tant *in vitro* qu'*in vivo*.

Raffiner : une définition précise de points limites précoces et prédictifs ainsi qu'une surveillance adaptée des animaux permet de limiter l'apparition d'une souffrance ou d'une atteinte de l'état général de l'animal. En cas d'atteinte de ces points limites les animaux sont sortis de l'étude et mis à mort. Des mesures préventives seront prises pour éviter toute souffrance de l'animal, injection d'analgésique systémique ou local avant les interventions, placement sur champ opératoire afin de limiter le refroidissement corporel.

Réduire : le nombre d'animaux a été réduit au maximum sans toutefois compromettre le nombre de cellules nécessaires pour mener à bien les études vitro et vivo. Pour cela nous utiliserons 790 souris.

11075 Le cancer du poumon se place chez l'Homme au 2eme rang des cancers masculins, et chez la Femme au 3eme rang. Chez la Femme ce cancer est en progression constante avec une incidence qui a triplé au cours des 20 dernières années. Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer.

Les traitements en oncologie restent encore trop inefficaces, avec un taux de réponse moyen d'environ 20%, et évoluent vers le ciblage de plus en plus spécifique des thérapies, avec un rapport efficacité/effets secondaires bien plus bénéfique pour les patients. Néanmoins, l'efficacité des traitements même ciblés en cancérologie reste encore insuffisante. Le challenge est de disposer de modèles précliniques prédictifs hautement caractérisés pour pouvoir détecter plus tôt dans leur processus de développement les thérapies anticancéreuses efficaces adaptées à une sous-population ciblée de patients. Il est désormais communément admis que les modèles de xénogreffe dérivés de tumeurs de patients (PDX), sans manipulation *in vitro*, sur des animaux immunodéficients reflètent mieux la biologie tumorale humaine que les tumeurs obtenues à partir de lignées cellulaires. L'établissement de ce type de modèles tumoraux, par la greffe de tumeurs cancéreuses d'origine humaine dans les souris, offre la possibilité de représenter la diversité génétique des tumeurs et notamment des tumeurs qui ne répondent pas aux thérapies de référence.

Ce projet a pour but de développer au maximum 10 modèles PDX (Patient Derived Xenograft) correspondant à 4 types de cancer pulmonaire. La collecte du matériel biologique nécessaire, se fait en collaboration avec des services de chirurgie, de clinique, et d'anatomopathologie dans le respect de la réglementation en vigueur à ce jour (consentement éclairé, sérologies, anonymat).

Une fois la caractérisation biologique effectuée, la prédictibilité des modèles *in vivo* sera évaluée via des études pharmacologiques avec des molécules de référence (monothérapies et combinaisons), comparaison des résultats obtenus avec les données des patients au travers du suivi clinique. Enfin, les modèles pourront être utilisés pour tester de nouvelles molécules, identifier de nouvelles cibles ou marqueurs de réponse aux traitements, avec un transfert vers la clinique, au bénéfice direct des patients.

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit à minima sans mettre en péril la production de matériel qui sera nécessaire à l'établissement et la caractérisation des modèles. Une définition précise des points limites, l'administration d'analgésique en pré-opératoire et une surveillance adaptée des animaux permettent de limiter au maximum la souffrance animale.

Le nombre estimé de souris pour ce projet est de 470 sur une durée de 5 ans.

11076 La radiothérapie, utilisée seule ou en combinaison avec la chirurgie et/ou la chimiothérapie, concerne aujourd'hui 50 à 70% des traitements contre le cancer.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet du fractionnement de la radiothérapie, c'est-à-dire le nombre de séances d'irradiation, délivrée par des protons sur la croissance tumorale, l'implication des mécanismes de réparation des dommages de l'ADN et l'efficacité sur la réponse immunitaire antitumorale.

Le but est de démontrer que la modulation de la dose par séance et du nombre de séances, à savoir une fraction versus trois fractions, peut induire des effets différents avec des équivalences de doses totales biologiques.

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

Une première partie de l'étude s'intéressera à l'efficacité des traitements sur la croissance tumorale. Dans une seconde partie nous évaluerons l'effet des traitements sur les mécanismes de réparation de l'ADN et la réponse immunitaire anti tumorale.

360 souris seront nécessaires pour obtenir des résultats fiables tout en respectant la démarche 3Rs :

Remplacement : après des tests préalables n'impliquant pas le vivant, seule une étude sur des modèles animaux permettra d'analyser l'effet des modalités d'administration de la radiothérapie sur la réponse immunitaire et la croissance tumorale. Les résultats finaux obtenus permettront de fixer le schéma d'administration de radiothérapie par protons le plus efficace en terme d'effet direct sur la tumeur, mais aussi propice à l'association de la radiothérapie avec des immunothérapies qui sont actuellement évaluées dans de nombreux essais et dont les effets sont prometteurs pour les patients.

Réduction : Pour chaque expérience, 3 groupes de souris, un contrôle et 2 groupes de traitements, seront évalués. L'évaluation des traitements sur la croissance tumorale sera effectuée avec des groupes de 15 animaux et l'analyse biologique sera réalisée à différents points de cinétique avec des groupes de 7 animaux. Les effectifs ont été réduits au mieux au regard de la variabilité des résultats obtenus sur l'étude du système immunitaire dans l'efficacité du traitement.

Raffinement : Les souris seront surveillées quotidiennement, et la croissance des tumeurs sera mesurée trois fois par semaine. Les données seront intégrées à l'aide d'une grille d'évaluation (état de stress, niveau de douleur, taille de tumeur, etc.) et l'animal pris en charge selon le score obtenu (traitement contre la douleur si nécessaire), avec mise à mort dès lors qu'un point limite sera atteint. Des études préalables nous ont permis de définir les points limites les plus précoces afin d'éviter toute souffrance des animaux. Les procédures expérimentales du projet seront réalisées par des personnes habilitées et formées. Les animaux seront hébergés selon les normes en vigueur avec des conditions d'ambiance et d'enrichissement de leur environnement conformes aux besoins de leur espèce.

11077 Des études épidémiologiques récentes décrivent une association entre l'exposition au BPA (Bisphenol A), qui est un perturbateur endocrinien, le diabète de type 2 (DT2) et les pathologies cardio-vasculaires.

Des études expérimentales, chez l'animal, montrent que le BPA exerce un effet délétère sur l'équilibre énergétique et l'homéostasie glucidique, ainsi que sur les fonctions gonadiques et le risque tumoral dans la descendance.

En revanche, a été peu exploré l'effet d'une exposition paternelle ou maternelle au BPA, sur la programmation de la masse beta-cellulaire et le risque de Diabète de Type 2 (DT2) dans la descendance (F1).

En outre, les usages du BPA en lien avec l'alimentation étant interdit par les autorités sanitaires, des molécules lui sont substituées comme le Bisphenol S (BPS), qui est aussi un perturbateur endocrinien, que l'on retrouve dans un grand nombre de produits de consommation courante alors labellisés « sans BPA ».

Or, le BPS présente une activité oestrogénique analogue à celle du BPA, il est retrouvé dans les urines de 80% de la population et l'on ne dispose actuellement d'aucune donnée quant à ses effets sur l'homéostasie glucidique et le risque de DT2.

Au regard de l'ensemble de ces éléments nous nous proposons d'étudier l'impact de l'administration de BPA ou de BPS à des rats mâles Wistar (futurs géniteurs), sur le développement et la fonctionnalité du pancréas endocrine de leur descendance à différents stades embryonnaires et à l'âge adulte de 6 mois.

Pour ce projet il n'existe pas de méthode de remplacement à celle faisant appel aux modèles animaux. Ils sont les seuls à nous permettre d'appréhender les paramètres structurels et métaboliques du pancréas, ainsi que les taux hormonaux circulants. Le choix du rat Wistar pour

cette étude réside dans le fait qu'il présente de grandes similitudes dans sa physiologie et physiopathologie avec celle de l'Homme.

Cette étude se fera dans le respect de la règle des 3R en utilisant un minimum d'animaux. Nous mettrons en place des conditions d'élevage (enrichissement de l'environnement) et de tests (raffinement des procédures) respectueux du bien-être animal.

Au cours de cette étude qui durera 5 ans, nous utiliserons 540 animaux

11078 Ce projet étudie l'écologie évolutive des salmonidés dans le contexte de la colonisation des Îles X par certaines des espèces de salmonidés introduites il y a 60 ans. La truite, *Salmo trutta*, est la seule espèce à avoir colonisé la quasi-totalité des bassins versants de la moitié Est de l'île. L'expérience grandeur nature initiée par ces introductions est d'un intérêt majeur, dans un contexte de réchauffement et de recul rapide des glaciers dans cette région. Les bases d'échantillons et de données existantes permettent d'explorer les questions scientifiques portant sur le succès des invasions et l'adaptation des espèces en relation avec les changements rapides de l'environnement. Un premier modèle d'invasion des rivières par la truite repose sur plusieurs hypothèses qui restent à valider et concernent leur vie en mer et leurs capacités de dispersion. Cette phase de vie en mer est encore mal connue, même dans l'hémisphère nord (origine des salmonidés). A partir de 12 rivières d'introduction, 42 abritent maintenant une population de truites anadromes (pouvant migrer en mer au cours de leur cycle de vie, mais se reproduisant en eau douce) dans la moitié Est de l'île. Les rivières de la moitié Ouest sont encore vierges de poissons et sont susceptibles d'être explorées ou colonisées. Notre objectif est de comprendre lesquelles sont explorées, à quelle fréquence, par combien d'individus, à quelle distance d'une rivière peuplée et quelles sont leurs caractéristiques (débit, accessibilité).

Un suivi par pistage acoustique de l'exploration des rivières par les truites de mer a été initié en janvier 2018 en front de colonisation (objet principal de la précédente saisine). Des récepteurs acoustiques répartis sur 10 estuaires, contrôlent le passage de 50 truites adultes portant un émetteur (fréquence 60-90 secondes, identité, salinité et température du milieu) pendant une année.

Au cours de la même période, nous procéderons à des pêches électriques de contrôle de certaines de ces rivières afin de suivre leur statut de colonisation et l'état de développement des éventuelles populations. Lors de chacune de ces pêches, les poissons sont anesthésiés, pesés, mesurés et subiront un prélèvement d'écaillés avant d'être relâchés (maxi 200 individus par rivière sur un linéaire de quelques centaines de mètres, tous stades de développement, soit 2000 individus au maximum sur 10 rivières prospectées).

- Réduire le nombre de sujets expérimentés ?

L'introduction des truites à X constitue une vraie expérience d'introduction en grandeur réelle, avec un suivi remarquable depuis l'origine. Elle est unique au monde et maintenant irréalisable car il est interdit d'introduire volontairement une espèce exogène dans la réserve naturelle des îles X. Il est donc important d'en tirer le meilleur parti pour améliorer nos connaissances générales sur les mécanismes des invasions (2ème cause d'érosion de la biodiversité). Ces inventaires des populations colonisatrices sont indispensables pour l'analyse des données des déplacements de 50 truites marquées dans la campagne précédente, car elles nous permettront de savoir si les rivières visitées sont vierges ou, si elles sont peuplées, quelle est leur densité.

- Raffinement des méthodes ?

La capture de poissons en eau douce s'effectue par pêche électrique. Cette méthode est peu nocive lorsqu'elle est bien maîtrisée (intensité, durée de l'électronarcose), mais inefficace en eau salée. La pêche au filet provoque des blessures, elle est donc proscrite. La pêche à la ligne avec un hameçon simple permet de capturer les poissons en mer pour les compléments de nos sondages. Toutes les opérations (biométrie et prélèvements d'écaillés et de petits bouts de nageoire pelvienne) sont réalisées à proximité du lieu de capture en limitant les transferts à leur minimum. Tous les poissons sont relâchés sur leur lieu de capture. Il est peu prévisible de trouver d'autres espèces introduites sur les sites prospectés. D'éventuels *Salvelinus* (*fontinalis* ou *alpinus*) capturés seront

immédiatement relâchés sans aucune manipulation (hormis une photo et un signalement en vue de futures opérations).

- Remplacer cette expérience par d'autres moyens de recherche ?

Cette situation expérimentale fortuite est unique. Il est impossible de la répéter. Les autres introductions de salmonidés n'ont jamais fait l'objet d'un tel suivi. Il n'existe aucune référence dans la littérature sur la colonisation naturelle de rivières vierges de poissons. Il faut donc tirer le meilleur parti de cette opportunité, qui permettra d'anticiper ce qui se passera dans quelques dizaines d'années dans les régions froides de l'hémisphère nord et permettra aux structures en charge de la gestion piscicole et de l'environnement de gérer au mieux ces situations.

11079 L'anxiété affecte 15-25% de la population dans les pays développés et constitue un problème majeur de santé publique. Parmi les médicaments les plus fréquemment utilisés, on peut citer le Valium, le Prozac, le Buspar et le Zoloft.

Cependant ces traitements présentent des effets secondaires majeurs. Par exemple, le Valium entraîne des troubles de la mémoire, une somnolence, une addiction ainsi qu'un syndrome de sevrage. Ainsi, la recherche de nouveaux médicaments sans les effets notoires des anxiolytiques actuels reste un défi.

Nos modèles d'anxiété basés sur l'analyse du comportement de souris demeurent à l'heure actuelle les plus pertinents et les seuls validés par la communauté scientifique. Ces modèles ont permis d'étudier les mécanismes physiopathologiques des troubles anxieux et permettent ainsi de développer de nouveaux traitements, pharmacologiques ou comportementaux. Remplacer : Bien qu'il soit possible de disséquer les mécanismes d'action des nouveaux médicaments *in vitro*, les réponses comportementales des animaux induites par ces nouveaux traitements sont des événements difficiles à simuler et à prédire par des expériences *in vitro*. De plus, ces expérimentations permettent de faire un lien avec une éventuelle application clinique. Elles sont ainsi incontournables avant une étude clinique et ne peuvent être remplacées par des expérimentations *in vitro*.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesures sont mises en œuvre notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement adaptées (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis. Réduire : nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 10 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 12-20 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement fiable et évite ainsi la répétition d'expériences. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 8400 souris est envisagée.

11080 La thérapie cellulaire est une nouvelle approche prometteuse visant à utiliser des cellules présentant des propriétés de réparation d'organes endommagés. Ces cellules pourraient se différencier en de nouvelles cellules fonctionnelles et/ou aider à la réparation du tissu endommagé par la sécrétion de différents facteurs. La moelle osseuse a par exemple été démontrée comme contenant une population cellulaire capable d'exprimer de telles propriétés, mais ces cellules sont retrouvées en faible quantité et leur extraction suppose une approche invasive, douloureuse et souvent risquée. De façon inattendue, le tissu adipeux a été montré depuis comme contenant lui aussi cette population cellulaire (ASC pour Adipose Stromal Cells) retrouvée en quantité nettement plus importante que celle retrouvée dans la moelle osseuse. Les ASCs présentent de réels potentiels thérapeutiques *in vivo* et les effets de leur transplantation dans de nombreux contextes pathologiques font l'objet de nombreuses attentions. A ce jour, l'utilisation de ces cellules suppose une biopsie de tissu adipeux, puis leur isolement à partir de l'échantillon de tissu prélevé et enfin,

leur culture extensive *in vitro*, ce qui conduit à de nombreuses impasses thérapeutiques. Or il a récemment été montré que le tissu adipeux libère des ASCs dans la circulation générale, et ce, lors de situations inflammatoires. Ces résultats sont tout à fait originaux et modifient complètement notre vision de la biologie du tissu adipeux. En effet, cela suggère qu'en plus d'être un réservoir de cellules au potentiel de régénération, le tissu adipeux pourrait mettre cette population de cellules « thérapeutiques » à disposition de l'organisme en fonction de ses besoins. Le projet de recherche dans lequel s'inscrit cette demande d'expérimentation s'intéresse donc à la fonction de la circulation endogène des ASCs et aux mécanismes qui contrôlent leur libération par le tissu adipeux. Les objectifs de ce projet seront (i) d'identifier des situations physiologiques et physiopathologiques (autre que l'inflammation) déclenchant la libération des ASCs par le tissu adipeux (ii) de caractériser les facteurs responsables de cette libération et (iii) de moduler cette libération pour favoriser la réparation/régénération de certains tissus. La présente demande concerne les 2 premiers objectifs du projet de recherche *i.e.* caractériser les situations physio/pathologiques lors desquelles la libération des ASCs se produit et définir les facteurs et les mécanismes impliqués. Quand cela a été possible le principe des 3R, qui substitue, réduit ou améliore le recours aux animaux a été appliqué. Par exemple, pour réduire le nombre d'animaux, une grande partie de ce projet sera réalisée *in vitro* (compréhension des mécanismes de migration), toutefois l'étude *in vivo* du déclenchement de la libération des ASCs et de l'impact de cette libération sur l'organisme entier reste indispensable. Le choix du modèle animal utilisé dans ce projet, la souris, tient compte de l'état actuel des connaissances tant d'un point de vue de l'espèce choisie que des protocoles envisagés. Les procédures présentées dans ce projet n'ont pas de raison expérimentale et/ou chirurgicale de générer une détresse ou une souffrance de l'animal, toutefois une observation journalière des animaux à la recherche des signes indicatifs de douleur ou de détresse sera réalisée par l'étude du comportement ainsi que l'apparence de l'animal. Les procédures expérimentales nécessaires à ce projet sont maîtrisées par du personnel compétent ce qui permet de les réaliser rapidement ou si nécessaire sous anesthésie tout ceci afin de réduire au maximum tout angoisse et/ou stress potentiellement générés. Par ailleurs, un enrichissement du milieu de vie ainsi qu'un suivi quotidien des animaux sera effectué. Cette demande d'autorisation de projet utilisera 2490 souris. Selon les procédures et les différents paramètres évalués, les différences seront analysées et comparées aux groupes ou aux conditions contrôles grâce à des outils statistiques non paramétriques d'échantillons indépendants de Kruskal-Wallis ou des tests paramétriques d'échantillons indépendants de type ANOVA suivis de post-hoc test de type Bonferroni ou Dunnett selon les procédures et les groupes. Ce projet, innovant, devrait offrir de nouvelles perspectives de thérapie cellulaire régénérative, peu invasive, pouvant bénéficier à différents types de patients (diabétiques, myopathes et vieillissants).

11081 L'ischémie-reperfusion (IR) rénale est une des causes majeures de complications après une greffe de rein. L'IR rénale est aussi provoquée par nombre d'autres événements entraînant un flux sanguin minoré vers les reins comme par exemple le choc septique, le choc anaphylactique, l'hypotension etc. Dans la suite l'IR rénale peut conduire à une insuffisance rénale aiguë et chronique. Cette pathologie est un enjeu de santé publique puisqu'elle concerne 2 à 7 % des patients hospitalisés.

L'objectif scientifique de ce projet est de comprendre le rôle des cellules mastocytaires dans le tissu rénal et en particulier un de leurs médiateurs libérés, la chymase MCPT4, dans la survenue de de cette pathologie grâce à l'étude des animaux déficientes pour cette protéase (souris MCPT4-/-).

Basé sur les questions de rapporteurs d'une publication actuellement en révision qui décrit un rôle protecteur de la chymase MCPT4 nous soumettons cette demande d'autorisation pour mener deux types d'expériences supplémentaires exigés par les rapporteurs. Il s'agit 1) de démontrer si le mécanisme d'action de la chymase MCPT4 implique sa capacité à contrôler l'inflammation des neutrophiles, un type de globules blancs, qui infiltre le rein après une IR rénale. 2) d'évaluer si, suite à une IR rénale, la chymase MCPT4 agit de manière systémique impactant en plus des reins d'autres compartiments de l'organisme.

L'IR rénale est caractérisée par une réponse inflammatoire complexe et systémique. Ces expériences peuvent donc être menées que dans le contexte pathophysiologique de l'organisme

entier impliquant un acte chirurgical classé comme procédure sévère. Néanmoins, une connaissance plus approfondie de ces mécanismes permettra de proposer de nouvelles approches pour le traitement de l'IR rénale.

Nous utiliserons pour nos expériences des souris génétiquement modifiées déficientes pour la chymase MCPT4 (souris MCPT4^{-/-}) et les souris contrôles (C57/Bl6). Le phénotype de ces souris n'est pas dommageable. Nous comptons : 1) mener des expériences éliminant les neutrophiles dans les souris MCPT4^{-/-} par injection d'un agent actif en intrapéritonéale (ou solvant pour les souris contrôles) 24 h avant l'induction d'une IR rénale bilatérale par acte chirurgical sous anesthésie/analgésie. Pour évaluer l'effet de la déplétion des neutrophiles sur la fonction rénale nous prélèverons juste avant euthanasie (24h après l'IR) 200 à 500 microlitres de sang en rétro-orbital sous anesthésie/analgésie. S'agissant d'une procédure sévère nous maintenons les souris sous analgésie pendant toute la procédure (48h) et les animaux sont surveillés au minimum 3 fois par 24 h pour tout signe d'angoisse, de douleur et de détresse. 2) analyser le rôle de la chymase MCPT4 après induction d'une IR rénale bilatérale dans un compartiment tissulaire distal. Ainsi, 3h après l'IR par acte chirurgical sous anesthésie/analgésie dans les souris MCPT4^{-/-} et contrôles (C57/Bl6), nous provoquons sous anesthésie/analgésie une inflammation de la voûte plantaire de la patte arrière droite par injection d'une petite quantité (20 microlitres) d'un agent actif pro inflammatoire. La patte arrière gauche est utilisée comme contrôle et sera injecté avec du solvant uniquement. L'inflammation est ensuite évaluée en mesurant le développement de l'œdème des voûtes plantaires pendant 1h (mesuré tous les quinze minutes). Puis, les souris sont euthanasiées. Pendant toute la procédure d'environ 5h les souris sont analgésiées et observées en continue.

Remplacer : Dans la mesure du possible, des expériences *in vitro* sur des lignées cellulaires seront menées pour limiter le recours aux animaux. Nous estimons à 108 le nombre total de souris qui seront utilisé pour une période de neuf mois. Toutes les souris seront euthanasiées à la fin des expériences. Réduire : Ce projet est conforme aux règles des 3R en limitant le nombre d'animaux au minimum requis pour la validité statistique tout en gardant les contrôles adéquates permettant d'apporter les conclusions scientifiques irréfutables (nombre de souris sur les modèles des publications). Raffiner : Les signes extérieurs de souffrance chez la souris (état prostré, poils hérissés, yeux fermés, perte de poids) seront les critères de points limites, à partir desquels la souris sera euthanasiée.

11082 Une cellule humaine possède différents compartiments intracellulaires dont les contours sont délimités par des membranes. Ces compartiments communiquent entre eux via des vésicules qui transitent au sein de la cellule. Ces vésicules définissent le trafic intracellulaire qui permet le déplacement de protéines et récepteurs spécifiques. Les protéines SNARE permettent la fusion des vésicules avec leur compartiment cible et sont ainsi des acteurs majeurs du trafic intracellulaire. Nous étudions le rôle de l'une d'entre elles dans le cancer ainsi que celui d'une petite protéine liant les sucres impliquée dans la stabilité de certains récepteurs à la membrane plasmique. En effet, Les récepteurs présents à la membrane plasmique sont importants pour l'interaction des cellules entre elles et avec leur environnement et leur réponse. Cela influence donc le devenir de cellules individuelles et par là-même celles des cellules cancéreuses et le développement tumoral. Nous avons choisi d'étudier le cancer du sein comme modèle puisqu'il est la principale cause de mortalité chez la femme entre 35 et 65 ans.

Nous disposons de souris invalidées pour ces deux protéines croisées avec des souris développant des tumeurs mammaires afin d'étudier l'effet de l'absence de ces protéines dans la tumorigenèse. Notre but est de voir s'il existe des différences dans le temps d'apparition des tumeurs mammaires, dans leur vitesse d'évolution et leurs caractéristiques. Cela sera évalué par un suivi régulier des animaux pour estimer le temps d'apparition des tumeurs par palpation au début, leur développement par calcul de la taille des tumeurs à l'aide d'un appareil d'échographie dédié au petit animal. En parallèle, une caractérisation histologique et biochimique des tumeurs sera effectuée après mise à mort d'animaux à différents stades de la tumorigenèse.

Ces études dans l'animal sont incontournables. En effet, nous avons déjà montré sur des cellules en culture l'implication de nos protéines dans la migration cellulaire et l'adhérence cellulaire

(cellule/cellule ou cellule/matrice), processus fortement impliqués dans la progression tumorale. Or les cellules ne nous permettent pas de prendre en compte d'autres facteurs entrant aussi en jeu dans le développement tumoral en particulier l'angiogenèse (irrigation des tumeurs permettant leur développement), ainsi que tout ce qui a attiré au système immunitaire.

Les études que nous avons effectuées précédemment nous ont permis d'optimiser le suivi des animaux par échographie. Ceci limite le nombre d'animaux utilisés puisque ce sont les mêmes souris qui sont suivies à différents temps. 88 souris femelles seront nécessaires pour réaliser ces projets et produire des résultats fiables. Nous veillons au bien-être animal en améliorant et en surveillant leur état de santé. Le suivi clinique des souris se fait deux fois par semaine et est renforcé vers l'âge de 6 semaines avec le début des palpations tous les 2-3 jours. Nous chercherons à éviter et limiter la douleur et la souffrance à appliquer les points limites établis préalablement et à utiliser les procédures réglementaires et appropriées de mise à mort.

Par ces études, nous espérons ainsi définir le rôle de nos protéines d'intérêt, dans le développement tumoral dans son ensemble. Ce travail pourra vraisemblablement nous permettre d'envisager ces protéines ou leurs partenaires comme de nouvelles cibles thérapeutiques.

11083 Objectif scientifique du projet :

Une altération du matériel génétique de certaines cellules de l'organisme entraîne un dysfonctionnement des cellules qui, progressivement, perdent le contrôle de leur prolifération, deviennent immortelles et se développent de façon anarchique dans l'organisme pour générer une tumeur maligne. L'organisme via l'activation de son système immunitaire permet grâce à la mobilisation de plusieurs types de cellules immunes spécialisées et la production de molécules de combattre les agressions extérieures (infection virale ou bactérienne) mais aussi d'éliminer la majorité des cellules tumorales. Néanmoins dans le cas de tumeurs établies l'environnement tumoral détourne la fonctionnalité de ce système immunitaire à son profit. Le cancer n'est plus vu uniquement comme le résultat d'une altération génétique mais comme une maladie de l'organisme, de l'environnement de la tumeur et du système immunitaire. Le concept d'immunothérapie vise à réactiver les fonctionnalités normales du système immunitaire pour qu'il soit de nouveau apte à considérer les cellules tumorales comme anormales et devant être éliminées. Très schématiquement, l'immunothérapie peut se résumer à deux pistes :

1) si le système immunitaire ne reconnaît pas la tumeur comme étrangère à l'organisme, il va falloir induire une réponse en l'éduquant, c'est-à-dire en lui apprenant à la reconnaître comme dangereuse.

2) si la réponse est là, mais pas assez forte, il s'agira alors de la stimuler, pour lui donner une dimension qui soit à la hauteur de son adversaire.

Le but de cette étude est d'induire une réponse immune grâce à l'injection d'une protéine P qui serait capable d'induire une « auto-vaccination » contre la cellule tumorale. Des données préliminaires, *in vitro*, suggèrent que cette protéine possède un mécanisme d'action innovant puisqu'elle agit comme un agent immunostimulant qui cible un des acteurs importants du système immunitaire (les cellules dendritiques et les monocytes) qui initie la réponse immune et induit leur activation/maturation.

Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie :

La validation en modèle préclinique de la capacité de la protéine P à potentialiser l'efficacité de faibles doses de signaux de danger (ligand de TLR) et générer une réponse immunitaire mémoire au site de la tumeur injectée mais aussi au niveau systémique, permettra de pousser son développement clinique pour induire une immunisation de novo de l'homme contre des antigènes tumoraux endogènes.

Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement et nombre total d'animaux inclus dans ce projet :

Le système immunitaire est biologiquement très complexe, faisant intervenir de multiples types cellulaires qui interagissent entre eux et une organisation spatiale qui rend impossible son étude

par des tests *in vitro* exclusivement. De plus, les interactions entre le système immunitaire et les cellules tumorales représentent un niveau de complexité encore supérieur en termes de communication faisant intervenir différents types cellulaires sensibles au microenvironnement intra tumoral et aux interactions spatiales intercellulaires. Malgré les progrès récents dans les domaines de la culture cellulaire organoïdes, l'étude de la croissance des tumeurs et la validation de l'efficacité de drogues potentielles ne peuvent actuellement pas être remplacées par des systèmes *in vitro* fiables.

Pour chacune des procédures expérimentales, le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et reproductibles.

Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par des personnels compétents permet de limiter au maximum toute souffrance animale.

Le nombre maximal de souris utilisées dans ce projet est de 425.

11084 Les maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose sont la première cause de mortalité dans le monde. Le rôle joué par les lipides notamment les acides gras dans l'inflammation associée à l'athérosclérose est une piste thérapeutique prometteuse. L'enzyme appelée lysophosphatidylcholine acyl transférase 3 (LPCAT3) joue un rôle important dans le métabolisme des acides gras et des phospholipides. Le but du projet est d'étudier l'influence d'un déficit en LPCAT3 sur le développement de l'athérosclérose chez la souris.

Le développement de l'athérosclérose sera étudié dans 2 modèles de souris génétiquement modifiés qui reproduisent les caractéristiques physiopathologiques de l'athérosclérose chez l'Homme. Elles seront nourries avec un régime enrichi en cholestérol (CS) pour induire l'athérosclérose. Ces souris susceptibles à l'athérosclérose seront soit croisées avec des souris n'exprimant pas LPCAT3 de manière globale (LPCAT3 KO) ou greffées avec des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de ces souris LPCAT3 KO. La greffe de CSH permet de générer des souris qui présentent une déficience dans le gène d'intérêt uniquement dans les cellules hématopoïétiques (c'est-à-dire les cellules souches donnant naissance aux cellules présentes dans le sang). Ces cellules sanguines jouent un rôle prépondérant dans le développement de l'athérosclérose. La greffe de CSH doit être réalisée chez des animaux ne possédant plus de cellules hématopoïétiques. Cette suppression est obtenue par une irradiation des animaux.

Remplacement. L'utilisation de modèles murins pour étudier l'athérosclérose est nécessaire car l'athérosclérose est un processus physiopathologique complexe ne pouvant pas être modélisé *in vitro*. Les fortes similarités entre la souris et l'homme permettent d'extrapoler les conclusions à la situation humaine. La souris est le seul modèle disponible pour étudier les conséquences d'une déficience en LPCAT3. Réduction. Le nombre d'animaux prévus est calculé sur la base d'études antérieures. Compte tenu de la variabilité interindividuelle et des effets biologiques observés après l'inactivation de gènes clés, des groupes de 10 animaux seront utilisés pour établir des différences dans la formation de lésions athéromateuses. Les expériences seront réalisées chez des souris mâles et femelles afin de tenir compte du dimorphisme sexuel. Raffinement. L'irradiation et les régimes alimentaires utilisés (régime riche en CS), conduisant à la formation de plaques d'athéromes sont indolores. Durant cette période de prise de la greffe, les animaux recevront des antibiotiques afin de limiter le risque infectieux. Les prises de sang seront réalisées sous anesthésie gazeuse de même que l'euthanasie des animaux. Les animaux seront surveillés de manière journalière. Si une perte de poids supérieure à 20% du poids corporel est observée sur une période de 2 jours, les animaux seront euthanasiés après anesthésie. Ce type d'évènements est extrêmement rare. Nous ne pourrions pas administrer de traitement antalgique afin de ne pas interférer avec notre expérience qui repose sur l'étude de l'inflammation. 396 souris seront utilisées sur 5 ans.

11085 L'Hypermutation Somatique est un mécanisme qui améliore le potentiel des anticorps donc nos défenses immunitaires. Ce processus s'opère normalement dans les Lymphocytes B (globules blancs producteurs d'anticorps) des animaux mais, malheureusement, ne peut pas être reproduit « *in vitro* » dans des modèles de cellules en culture. L'étude des Hypermutations Somatiques

nécessite obligatoirement l'emploi d'animaux car il repose sur des mécanismes faisant intervenir un environnement cellulaire complexe, dans des organes lymphoïdes organisés tels que la rate, les ganglions, les plaques de Peyer. Il est primordial d'étudier les mécanismes régulant l'Hypermutation Somatique non seulement pour la compréhension des réponses immunitaires mais également pour la compréhension des mécanismes qui sont à l'origine des cancers des cellules B (lymphomes) dans lesquels l'Hypermutation Somatique n'est plus contrôlée.

Ce projet utilise au total 980 souris.

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

REPLACER : les modèles *in vitro* (cellules B en culture) ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier et en particulier ne permettent pas d'évaluer le mécanisme d'Hypermutation somatique. Ce mécanisme complexe d'Hypermutation somatique ne peut être évalué efficacement qu'à l'aide de modèles murins KI ou KO pour des régions régulatrices des gènes d'Immunoglobulines ou des facteurs nucléaires qui régulent ces derniers.

REDUIRE : la génération et l'étude des modèles murins KI ou KO (de régions régulatrices ou de facteurs nucléaires) sont maîtrisés par l'équipe et le porteur de ce projet, ce qui permet de limiter les étapes de mises au point. De plus, les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. L'organisation similaire des gènes d'Ig chez la souris et l'homme font de ce rongeur le modèle animal le mieux adapté pour cette étude de la régulation fine des mécanismes qui contrôlent la réponse immune.

RAFFINER : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie gazeuse réalisée préalablement pour tout type de prélèvement nécessaire au génotypage et immunisation, notre projet n'emploie aucune technique de chirurgie).

11086 Les chiens sont régulièrement utilisés pour la recherche biomédicale dans les domaines de santé animale (espèce cible) et humaine en particulier pour étudier les effets du médicament sur l'organisme (efficacité, tolérance.). Ces effets sont évalués par le suivi des variations de différents paramètres qui peuvent être par exemple biochimiques (changement du taux sanguin d'enzymes hépatiques, modification de la composition des urines.), hématologiques (modification du taux de globules rouges/blancs.) ou physiologiques (pression artérielle, fréquence cardiaque, respiratoire.). Concernant le suivi des paramètres physiologiques, celui-ci peut se faire manuellement (mesure de la fréquence cardiaque avec un stéthoscope, détermination de la fréquence respiratoire par observation de l'animal, mesure de la pression artérielle par méthode doppler) ou de façon automatique en utilisant des systèmes d'enregistrements autonomes lorsqu'il faut faire des mesures continues, très rapprochées ou que la manipulation des animaux interfère avec les mesures. Ces systèmes d'enregistrements peuvent être placés sur l'animal de façon non invasive (ex : par l'intermédiaire d'un gilet pour un électrocardiographe) ou de manière chirurgicale (ex : implant mesurant la pression artérielle).

Le but de ce projet est d'implanter de manière chirurgicale des dispositifs de télémétrie chez le chien permettant de mesurer de façon continue différents paramètres physiologiques comme la fréquence cardiaque, la pression artérielle et/ou la température corporelle sur des animaux vigiles. Ces animaux ainsi équipés pourront ensuite être utilisés après une période de récupération dans un ou plusieurs protocoles (étude de tolérance, d'efficacité, preuve de concept, étude de pharmacodynamie) qui ont fait ou feront l'objet de projets indépendants.

En moyenne, nous prévoyons d'opérer 12 animaux par an soit 60 sur 5 ans.

Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress. L'implantation du dispositif sera réalisée par un chirurgien

expérimenté sous anesthésie générale. Un traitement analgésique sera mis en place avant et après l'opération

11087 On estime à 385 000 le nombre de nouveaux cas de cancers et à 149 500 le nombre de décès en 2015 en France. Les cancers les plus fréquents sont ceux de la prostate, du sein, du côlon-rectum et du poumon. Au cours de ces 30 dernières années, certains cancers (comme le mélanome cutané, le cancer du poumon ou du système nerveux central) ont une incidence et une mortalité augmentées.

La prise en charge actuelle du cancer devient de plus en plus lourde du fait de maladies récidivantes ou réfractaires aux traitements conventionnels ; ainsi, de nouvelles solutions thérapeutiques s'imposent. L'objectif principal du présent projet est donc de trouver des molécules à activité anticancéreuse en ciblant la cellule tumorale et/ou son microenvironnement immunitaire sur des modèles animaux pertinents tout en étant le plus prédictif de leur efficacité chez l'Homme.

Dans le cadre de la Recherche sur le cancer, les études *in vitro* et les expérimentations *in vivo* sont des approches complémentaires.

Les modèles *in vitro* utilisent généralement des cellules tumorales d'origine humaine ou de rongeurs qui permettent de sélectionner l'efficacité d'un « candidat » par rapport à la cible visée. Ces études permettent de sélectionner de manière rationnelle les types cellulaires susceptibles d'être utilisés dans les modèles *in vivo*.

Forts d'une expérience certaine dans le domaine de l'immunité innée, nous proposons un grand nombre de réactifs de laboratoire relatifs à ce domaine d'application. Au sein du département R&D, nous développons différentes molécules immunomodulatrices qui se sont révélées avoir un intérêt en immuno-oncologie et nous souhaitons donc évaluer ces différents composés dans des modèles de cancer consanguins. Ces molécules sont dans un premier temps criblées *in vitro* via des tests cellulaires bien caractérisés, mais l'évaluation thérapeutique des molécules sélectionnées sur des modèles *in vivo* demeure nécessaire pour comprendre leur mécanisme d'action intégré surtout dans ce contexte où le système immunitaire est indispensable. Cet environnement tumoral s'avère donc une cible thérapeutique de choix dans la lutte contre le cancer. C'est la raison pour laquelle, nous développons :

- des modèles de greffes sous-cutanées : différents types de cellules cancéreuses peuvent être injectées en sous-cutané, le choix du type cellulaire dépendra de la cible à étudier. L'avantage de ce modèle est l'accessibilité de la tumeur permettant une évaluation rapide et non invasive pour l'animal (mesure de la taille de la tumeur) ainsi que la possibilité d'une large variété de tumeurs. Une administration par voie intra-tumorale sera également facilitée. Cette technique est généralement utilisée dans un premier temps pour évaluer *in vivo*, les molécules sélectionnées préalablement *in vitro*.

- des modèles d'allogreffes orthotopiques : les cellules cancéreuses sont implantées dans le tissu/l'organe d'origine de la tumeur. On peut ainsi évaluer l'effet thérapeutique de la molécule dans un environnement (cellules immunes, fibroblastes, cellules endothéliales...) plus physiologique et représentatif de la pathologie humaine.

- des modèles métastatiques : ce type de modèle permet de mimer certaines étapes du processus métastatique rencontré chez l'Homme afin d'évaluer le pouvoir anti-métastatique de la molécule candidate.

Pour le suivi de ces modèles oncologiques et afin de prévoir l'apparition de la douleur, nous avons établi des points limites précoces (critères d'interruption) et une grille d'observation qui déterminent les actions à suivre en cas d'inconfort de l'animal. De plus, la douleur, pouvant résulter de la mise en œuvre de certaines procédures (cas de la chirurgie par exemple), est prise en charge, dans nos protocoles, par la combinaison de l'anesthésie (molécules aux propriétés sédatives, narcotiques ; analgésiant ; myorelaxant) avec l'administration d'analgésiques en pré- et post-opératoire. D'autre part, afin de réduire tout stress ou détresse infligés aux animaux pendant l'expérimentation, nous mettons en œuvre des soins « per-opératoires » : vérification de la profondeur d'anesthésie (réflexe de retrait de la patte), surveillance de la fréquence respiratoire (couleur des muqueuses, pattes),

utilisation de tapis chauffant durant l'acte chirurgical ; utilisation de gel oculaire protecteur durant l'anesthésie (ayant pour but de limiter le dessèchement oculaire afin de préserver l'intégrité de la cornée des animaux anesthésiés) ; utilisation d'une lampe chauffante et de fibre naturelle de coton pendant toute la durée de la phase de réveil (compenser la déperdition de chaleur liée à l'anesthésie).

L'ensemble de ces procédures sont des mesures de raffinement et contribuent au bien-être de l'animal tout le long de l'expérimentation ainsi qu'à améliorer la qualité des résultats (éviter des données incorrectes obtenues à partir d'animaux souffrants ou stressés).

Enfin, la composante inflammatoire est différente selon le type de cancer et justifie le besoin de développer plusieurs modèles tumoraux ; d'autre part, ce type de stratégie d'immunothérapie antitumorale peut s'appliquer à différentes pathologies cancéreuses et nécessite donc une évaluation sur différents types de tumeurs qui ne peuvent pas être remplacés par des tests *in vitro*. Cependant pour réduire le nombre d'animaux utilisés, un criblage préalable est réalisé sur des essais *in vitro* et *ex vivo* afin de sélectionner les molécules candidates les plus efficaces.

L'ensemble de ce projet nécessitera 2 250 souris sur une période de 5 ans.

Les procédures sont réalisées par du personnel qualifié et habilité dans le cadre de la réglementation en vigueur.

11088 Un facteur limitant l'accès des agents anti-cancéreux au cerveau, pour le traitement du glioblastome (maladie incurable à ce jour), est la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière, constituée de cellules au niveau du compartiment vasculaire, bloque le passage de certains agents anti-cancéreux du compartiment sanguin vers les cellules du cerveau. Nous disposons d'un appareil adapté aux petits animaux permettant une ouverture temporaire et localisée de la BHE par ultra-sons. Ainsi la barrière peut être très localement rompue par application d'ultrasons, uniquement au niveau de la tumeur. Il en résulte un passage des agents anti-cancéreux uniquement vers le site tumoral en épargnant le tissu sain cérébral environnant (moins d'effets secondaires). Ce procédé de rupture de la BHE est non invasif, et réversible. Nous avons démontré au laboratoire l'innocuité et l'internalisation des nanoparticules métalliques (NP), sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses *in vitro* ainsi que chez la souris. Il a par ailleurs été démontré qu'une stimulation lumineuse (par laser) de ces nanoparticules provoque localement au niveau de la tumeur une élévation de la température induisant un effet antitumoral (thérapie par photothermie). Cette hyperthermie locale peut être monitorée de manière non invasive de façon à induire un traitement antitumoral sans douleur ou effet secondaire chez l'animal.

Cette présente demande s'inscrit dans un grand projet réalisé dans deux établissements utilisateurs. L'objectif du projet est de provoquer chez l'animal porteur d'une tumeur de glioblastome, la pénétration de ces nanoparticules au niveau tumoral, en forçant leur passage à travers la BHE vers la tumeur par une application localisée d'ultrasons. Les nanoparticules ainsi concentrées dans la tumeur seront ensuite activées par stimulation photothermique afin d'induire un effet antitumoral.

Dans cette présente demande, nous souhaitons procéder à un dosage dans le sang (étude pharmacocinétique) de ces nanoparticules à différents temps chez l'animal sain, après administration intraveineuse. Cette étude nous permettra de déterminer la durée de circulation des NP dans le sang après leur administration. Cette étude pharmacocinétique nous permettra de savoir à quel moment il faudra appliquer les ultrasons pour une pénétration maximale des NP dans la tumeur, puis induire la stimulation photothermique afin d'induire l'effet antitumoral. Ces deux dernières étapes feront l'objet de nouvelles demandes d'autorisations de projet.

Ces études seront conduites sur des souris C57Bl/6 saines. Au total, un maximum de 35 souris est prévu pour la globalité de l'étude.

Dans le souci du respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux prévu est minimum et suffisant dans chaque groupe. Il est basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 80% de chance d'arriver à un résultat statistiquement significatif. Pour le bien-être de l'animal, les souris seront hébergées selon les normes requises avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) et en groupes de 5 individus par cage afin d'éviter le stress de l'isolement. Les injections

intraveineuses ne devraient pas entraîner de douleurs particulières, mais elles feront l'objet d'une application préventive d'un analgésique local (naropéine). Une anesthésie générale (xylazine/kétamine) sera mise en place pour tous les prélèvements sanguins. Suite au traitement avec les NPs, nous serons attentifs au bien-être des animaux en observant tout changement dans leur comportement ou apparition de signes cliniques (posture, prostration, difficultés à respirer, à se déplacer, ataxie). Si de tels signes cliniques apparaissaient, les animaux seront euthanasiés sans délai.

11089 Ce projet a pour objectif l'évaluation de l'activité des vaccins et des médicaments immunogènes destinés à l'être humain, selon les normes d'innocuité et de sécurité réglementaires. Ce projet inclut également la calibration/validation des solutions antigéniques utilisées dans ces tests et requise par les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

Ces tests consistent à vacciner ou immuniser les animaux avec les produits à tester et à les héberger durant la période nécessaire au développement de l'immunité. Une épreuve infectieuse est ensuite réalisée afin de déterminer le niveau de protection des animaux contre les effets de la toxine ou du virus.

Ce projet représente l'ensemble des essais menés systématiquement sur les lots de produits fabriqués. Les espèces employées sont la souris et le cobaye.

Suite à l'épreuve infectieuse les animaux peuvent présenter des signes cliniques. Des points limites spécifiques sont alors définis.

La prise en charge d'un animal ayant des signes cliniques de maladie non attendus est réalisée sous la responsabilité d'un vétérinaire.

Ce projet peut nécessiter l'utilisation de 540500 souris et 201305 cobayes pour une durée de 5 ans.

Les bénéfices attendus de ce projet sont d'une part de contribuer à la libération de lots de produits conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur et d'autre part, d'assurer le niveau de formation / qualification du personnel pour chacun de ces tests conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication.

Suite à l'atteinte du point limite ou en fin de test, la majorité des animaux utilisés est euthanasiée selon les méthodes recommandées par la réglementation, par la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux et approuvées par le Comité d'Ethique. En l'absence de signes cliniques, des animaux peuvent être réutilisés pour des besoins de formation dans le respect des exigences réglementaires.

Mise en œuvre des 3R : Remplacement :

Les tests d'activité des vaccins et produits immunogènes sont réalisés sur animaux lorsque la réglementation l'impose. Certains de ces tests sont en cours de remplacement par des tests *in vitro* de type ELISA.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés au total est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins de tests sur la période considérée. Le nombre d'animaux par groupe est défini par la réglementation ou par une étude statistique. Il ne peut être réduit au-delà. En revanche, une optimisation visant à réduire le nombre de groupes témoins est pratiquée aussi souvent que possible.

Raffinement : Pour certains tests d'activité, des tests d'immunogénicité sont en cours de développement lorsqu'il n'est pas possible de supprimer l'utilisation de l'animal. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des enrichissements dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires (ETS 123), et suivis par un personnel spécifiquement formé. En cas de signes cliniques, dans les meilleurs délais, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés selon les méthodes recommandées.

11090 Très fréquent dans nos sociétés, l'asthme allergique est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes supérieures. Les études épidémiologiques montrent une disparité de la maladie entre les sexes, avec une prévalence augmentée de l'asthme chez les garçons par rapport aux filles avant l'âge de 10 ans, alors que cette tendance s'inverse à la puberté. Globalement, chez l'adulte,

l'asthme est plus fréquent et plus sévère chez les femmes. Ces observations suggèrent que les hormones sexuelles pourraient en partie contribuer à ce dimorphisme entre les hommes et les femmes. Chez la souris, ces mêmes différences sont observées, les souris femelles développant un asthme plus sévères que chez les mâles. Récemment, nous avons pu démontrer que les androgènes, hormones sexuelles mâles, limitent l'asthme chez les mâles en inhibant le développement d'une population centrale dans la maladie, les ILC2 (Innate lymphoid cell). Ces cellules vont produire en grande quantité les cytokines inflammatoires de type 2 à l'origine de la maladie. Nous souhaitons à présent dans notre projet comprendre si les androgènes agissent à un autre niveau en inhibant le repeuplement des ILC2 du sang vers les tissus. De plus, nous souhaitons tester si l'administration d'androgènes peut inhiber le développement de l'asthme. Pour étudier si les androgènes inhibent le repeuplement des ILC2 du sang vers les tissus, la mise en place de souris parabiontes, souris qui vont partager leur système sanguin, est la seule façon de répondre à la question (Procédure 1).

Nous avons estimé que le nombre minimal de souris nécessaires pour répondre à notre question est de 48. Un maximum d'analyse sera effectué sur les mêmes animaux afin de réduire leur nombre.

La chirurgie sera réalisée par un personnel spécialiste. En post-opératoire, les animaux seront analgésiés pendant 48h afin de réduire au maximum la douleur et l'accès à la nourriture facilitée pendant toute la procédure. Après ces 1er 48h, une perte de poids importante (>20% du poids initial) ou des signes de douleur ou de détresse (perte de toilettage, léthargie, tremblement, dos arqué) non soulagées par des antalgiques constituent des points-limites et donc l'arrêt de l'expérimentation par l'euthanasie des animaux.

Pour savoir si les androgènes peuvent représenter une cible thérapeutique intéressante, nous souhaitons pouvoir traiter les souris avec des androgènes, soit sous forme de pellets quand cela est possible soit via des mini-pompes osmotiques. Pour cela, les souris seront anesthésiées et recevront entre les omoplates un pellet ou une mini-pompe osmotique. l'incision sera refermée par une agrafe. Cette procédure n'entraîne généralement pas de douleurs. Cependant, une perte de poids importante (>20% du poids initial) ou des signes de douleur ou de détresse (perte de toilettage, léthargie, tremblement, dos arqué) non soulagées par des antalgiques constituent des points-limites et donc l'arrêt de l'expérimentation par l'euthanasie des animaux.

Nous avons estimé que le nombre minimal de souris nécessaires pour répondre à notre question est de 224. Un maximum d'analyse sera effectué sur les mêmes animaux afin de réduire leur nombre. (Total des souris = 272). Nous étudions l'impact des androgènes sur l'asthme allergique, en particulier l'impact de ces hormones sur le développement, le maintien et les fonctions des ILC2. Ces cellules sont régulées par de nombreux facteurs environnementaux, à la fois dans la moelle osseuse et dans les tissus périphériques, il est donc impossible de mimer cela par des modèles cellulaires in vitro non intégrés.

11091 Les plaquettes sanguines jouent un rôle essentiel pour arrêter les hémorragies. A l'inverse, une activation inappropriée des plaquettes est responsable de maladies cardiovasculaires, en particulier les thromboses artérielles menant à l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux, notamment suite au développement de plaques d'athérosclérose. Comprendre quels sont les mécanismes d'activation des plaquettes lors des thromboses est un préalable incontournable pour trouver de nouvelles cibles afin de diminuer le risque thrombotique chez les patients à risque. Ce projet fait appel à l'utilisation de souris transgéniques qui seront étudiées dans des modèles de thromboses bien caractérisés et ayant fait leurs preuves lors de tests de médicaments anti-thrombotiques. En parallèle, des prélèvements sanguins seront effectués pour réaliser des mesures *ex vivo*. Ces souris présentent des plaquettes dépourvues de récepteurs P1, P2 ou P1+P2 permettant de ressentir la rigidité et les contraintes de cisaillement sanguin. Or la rigidité des vaisseaux et les cisaillements du flux sanguin sont 2 paramètres fortement altérés chez les personnes présentant de l'athérosclérose. Actuellement, on ne connaît pas le rôle de ces récepteurs dans les plaquettes sanguines, bien que ces récepteurs soient suspectés de pouvoir jouer un rôle dans ces maladies artérielles.

Avantages escomptés : Ce projet permettra de comprendre comment les plaquettes ressentent les forces mécaniques dans la circulation sanguine, et comment ces récepteurs sont impliqués dans la formation des thromboses. L'idée finale est de déterminer si ces récepteurs pourraient être une cible pour empêcher les récives de thrombose artérielle chez l'homme, voire pour prévenir une première thrombose.

Remplacer : Pour cette approche de la question scientifique, certaines expériences utilisant la souris ne peuvent être remplacées par des études *in vitro*, d'une part car ces essais doivent être menés soit *in vivo* dans un organisme entier afin d'accéder à la complexité des mécanismes de la thrombose artérielle, soit *ex vivo* en utilisant des plaquettes isolées à partir du sang total, ces dernières étant dépourvues de noyau, il est impossible de réaliser ces expériences *in vitro* à partir de culture cellulaire. D'autre part la souris est la seule espèce pour laquelle on dispose de modèles dépourvus des protéines dont on cherche à étudier le rôle. Dommages prévus pour les animaux : Nos souris d'intérêt se développent et survivent normalement, et n'ont aucun phénotype dommageable. Les manipulations se font systématiquement sur souris en anesthésie profonde, sans réveil. Une fois les fonctions de ces récepteurs mises en évidence *in vivo* dans l'organisme entier, les expériences ultérieures pourront être réalisées *in vitro* sur sang humain en présence d'agents activateurs ou inhibiteurs.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés pour chaque condition de thrombose *in vivo* ou *in vitro* est fixé à 10, un nombre suffisant pour appliquer à l'étude un test d'analyse de variance ANOVA. Les résultats obtenus de l'analyse par ce test statistique permettront de ne pas répéter l'expérimentation, par conséquent réduire le nombre d'animaux utilisés et aussi les différents facteurs (douleur, souffrance ...) auxquels pourront être soumis les animaux (les souris). Pour les prélèvements sanguins, nous avons miniaturisé certains tests afin de pouvoir obtenir une mesure, voire plusieurs selon le test, avec le sang obtenu par prélèvement d'une seule souris. Au total, nous prévoyons un maximum de 440 souris par génotype, soit 2640 souris pour les 6 génotypes que nous allons comparer.

Raffiner : Le modèle animal est choisi dans le but de reproduire, le plus fidèlement possible, la thrombose artérielle ou disséminée et d'en tirer le maximum d'informations. Les conditions du travail seront raffinées afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés aux manipulations des souris avant l'anesthésie. Toutes les procédures expérimentales se feront sur des souris anesthésiées. Dans tous les cas, les cages sont enrichies en jouets et coton à déchiqueter pour qu'elles y fassent leur nid, et sont manipulées avec calme et par des manipulateurs avertis pour limiter le stress de contention dans l'intérêt du bien-être animal.

11092 Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice visqueuse. La formation d'un biofilm se fait selon un modèle bien établi et suit différentes étapes (adhésion, croissance, maturation et dispersion). On estime que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm. Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. Les bactéries du biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les cellules bactériennes planctoniques (non adhérentes). Ainsi, la présence de biofilm dans les infections est particulièrement redoutée en clinique (ex : sondes de ventilation mécanique, prothèses, cathéters veineux...). Parmi les espèces bactériennes largement retrouvées dans les biofilms figurent les espèces du genre *Staphylococcus* sp.

Le but de notre projet est de tester l'efficacité de la molécule BFP074F10 seule ou en association avec la cloxacilline sur la capacité à inhiber l'installation d'un biofilm à *Staphylococcus aureus* dans un modèle *in vivo* d'infection sur cathéter chez la souris BalbC. Deux souches seront testées et au total 140 animaux utilisés.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R.

L'hébergement des animaux sera pratiqué dans un milieu enrichi (jouet en plastique, igloo en carton). Le nombre d'animaux a été réduit à 7 souris par groupe au lieu de 10 compte tenu des

expériences précédentes menées au laboratoire et la procédure chirurgicale a fait l'objet de différentes mises au point, permettant d'optimiser le temps et la récupération des animaux. Un gros travail a été réalisé *in vitro* sur l'efficacité de cette molécule anti-biofilm ainsi qu'une pharmacocinétique chez la souris. Toutefois l'efficacité de tels composés ne peut être que confirmée dans des modèles précliniques, c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée. De plus, la technique d'infection sera réalisée sous une anesthésie fixe et une visite à 6 et 12h post infection sera réalisée par nos soins afin d'assurer au maximum le bien-être des animaux.

11093 Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche destiné à identifier de nouvelles molécules permettant de traiter la cirrhose hépatique. Cette pathologie est définie par l'accumulation excessive de fibrose conduisant à la dégénérescence du foie. A ce jour, elle est considérée comme irréversible, elle peut se stabiliser ou bien évoluer mais elle ne peut régresser. L'incidence annuelle de la cirrhose du foie en France est estimée à 150 à 200 cas par million d'habitants avec un nombre de décès d'environ 15000 par an. C'est une des complications majeures des maladies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine alcoolique, virale, métabolique ou liée à l'exposition à certains médicaments. La cirrhose constitue un véritable état précancéreux car elle s'accompagne d'une augmentation de la régénération des cellules hépatiques et donc du risque d'altérations génétiques. Parmi eux, le carcinome hépatocellulaire (CHC) est de loin le plus fréquent et il se développe dans plus de 90 % des cas sur une cirrhose, qu'elle qu'en soit l'origine. A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la cirrhose. Aussi, plusieurs voies de recherche et de développement sont en cours pour palier à ce déficit. Afin d'étudier et d'étayer nos hypothèses lors du développement de nos molécules, il nous sera inévitable d'avoir recours à des modèles animaux présentant une pathologie similaire à celle qui se produit chez l'Homme, des méthodes alternatives n'étant pas disponibles à ce jour. Il existe plusieurs méthodes pour induire expérimentalement une cirrhose hépatique chez l'animal de laboratoire. Nous utiliserons le modèle de cirrhose hépatique induit par l'administration chronique de thioacétamide (TAA) chez le rat. Le thioacétamide est un composé organosulfuré, utilisé en tant que fongicide, il est classé cancérigène de classe 2B. Ce modèle permet le développement d'une cirrhose, pouvant évoluer vers un hépatocarcinome. Les procédures expérimentales utilisées dans ce projet sont de classe sévère et seront réalisées dans les conditions les moins stressantes possibles pour les animaux.

Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3R. Les molécules ayant prouvé un potentiel thérapeutique dans ces études feront alors l'objet d'une évaluation chez l'animal. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant. Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être. Cette stratégie nous permet de définir préalablement des points limites éthiquement et scientifiquement acceptables, en tenant compte des objectifs de l'étude. A terme, nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de certaines formes de maladies hépatiques chroniques, aujourd'hui ce besoin médical est clairement établi. Ce projet engagera des rats et dans un nombre estimé à 5600 individus pour la durée que couvrira ce projet. Le nombre d'animaux utilisé dans chaque lot de chaque procédure est réduit, il correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'apprécier, avec nos moyens techniques et en fonction de la variabilité inter individus, les effets désirés.

11094 Utilisation de souris dyslipidémiques pour le développement et la caractérisation de modèles de stéatose hépatique et de stéatohépatite. Application à l'évaluation des propriétés thérapeutiques de nouvelles molécules.

La prévalence de la stéatose hépatique non alcoolique dans la population générale est estimée à 24%. En raison de la propagation pandémique de l'obésité, la NASH est l'une des causes principales de maladie hépatique. La NASH est un trouble métabolique se caractérisant par une accumulation progressive de lipides au niveau du foie puis d'un mécanisme inflammatoire associé ou non à une fibrose (cicatrisation des zones lésées du foie+ perte de fonctionnalité). L'étiologie de la pathologie est multifactorielle, les thérapies à mettre en place pour la combattre sont donc nombreuses, et pour les développer nous avons besoin d'avoir recours à des modèles expérimentaux divers.

Pour étudier la maladie, certains modèles sont créés en l'induisant avec un agent chimique, d'autres en reproduisant chez l'animal un trouble métabolique par une alimentation hyper riche. Dans notre projet, nous ferons appel à des animaux qui présentent des troubles métaboliques spontanés (animaux mutés ou transgéniques), ces troubles seront amplifiés par des régimes alimentaires gras, sucrés et hypercaloriques qui vont accélérer le processus d'évolution de la maladie. Nous étudierons différentes lignées de souris susceptibles à ces désordres du métabolisme, et nous les soumettrons à différents régimes alimentaires spéciaux afin d'établir un modèle dans lequel la pathologie s'installera rapidement et qui sera utile pour évaluer les propriétés thérapeutiques des produits que nous développons. Ce projet s'inscrit dans un programme global qui consiste à terme à proposer sur le marché des médicaments pour prévenir, et soigner cette pathologie. Ce besoin médical est clairement exprimé actuellement.

La pathologie d'origine métabolique est multifactorielle, elle ne permet pas d'établir des méthodes alternatives pour l'étudier telle qu'elle se présente chez l'homme. Pour cette raison nous ne pouvons éviter d'avoir recours aux animaux de laboratoire.

Pour restreindre le nombre d'animaux utilisés, nous ne procédons aux évaluations *in vivo* que des molécules ayant franchi avec succès les phases de sélection effectuées sur des modèles acellulaires ou cellulaires.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. Le recours à des produits analgésiques de type morphiniques pourrait être envisagé pour gérer la douleur. Nous prévoyons l'emploi de 3226 souris au cours de la durée couverte par ce projet.

11095 En collaboration avec un laboratoire extérieur, nous avons pour objectif d'étudier et développer une nouvelle approche innovante (combinaison de CRISPR/Cas9 = ciseau à ADN : technique de suppression et d'insertion de gènes sur des sites spécifiques et d'un vecteur de transport innovant. Ce système de thérapie génique, s'il fonctionne efficacement, pourrait à terme être transféré chez l'Homme pour soigner des maladies génétiques.

Nous développerons notre système de thérapie chez des souris modèles de la maladie de Duchenne (MD). Chez l'Homme, cette maladie génétique provoque une dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles de l'organisme. Elle est liée à une anomalie du gène DMD, responsable de la production d'une protéine impliquée dans le soutien musculaire. Ce gène étant situé sur le chromosome X, 99.9% des malades sont des garçons. On compte 25000 personnes environ affectées par la maladie en France. La maladie se manifeste généralement vers 3 ans, avec des chutes et des difficultés à se relever traduisant une faiblesse musculaire. Les muscles respiratoires, cardiaques et digestifs sont également touchés. Ainsi, la quasi-totalité des garçons atteints sont en fauteuil roulant à l'âge de 12 ans. L'espérance de vie, du fait de l'aggravation des troubles respiratoires, est en moyenne d'à peu près 25 ans. Actuellement, il n'existe pas de traitement permettant de guérir de la maladie. La prise en charge des patients repose sur la prévention et le traitement des complications, notamment des complications cardiaques et respiratoires. Seuls des corticoïdes sont utilisés pour tenter de ralentir la progression de la maladie. Notre but sera d'utiliser le système "ciseau à ADN" pour réparer des mutations génétiques héréditaires et corriger localement le phénotype lié à la maladie via différentes voies d'injections chez des souris modèles de cette maladie. Ce système devrait faciliter la suppression de la partie

malade du gène et ainsi reproduire une protéine au moins partiellement fonctionnelle. Des articles récents ont déjà montré la faisabilité d'une approche similaire pour la maladie de Duchenne. Ici, le but est d'adapter ces travaux en utilisant notre vecteur de transport innovant qui devrait permettre de limiter les effets secondaires et les risques de cette correction génétique contrairement aux systèmes publiés.

Remplacement : Une étude *in vitro* a déjà été réalisée à partir de myoblastes malades montrant la restauration de l'expression du gène DMD. L'étude de maladie génétique humaine et l'approche de thérapie génique nécessite l'utilisation d'expériences *in vivo* et ne peut donc pas être remplacée par des expériences *in vitro*.

Réduction : L'effectif des animaux est réduit au maximum. Un test statistique adapté sera utilisé pour l'analyse des résultats et tenant compte des risques de mortalité. 240 animaux seront nécessaires à l'étude.

Raffinement : Afin de réduire tout stress ou souffrance, toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale. Ainsi, des points limites éthiques seront établis afin d'arrêter les procédures en cas de douleur difficile à traiter à l'aide d'antidouleurs. A l'issue des études et grâce au partenariat avec le laboratoire extérieur, les données obtenues pourront servir à développer de nouvelles techniques de thérapie génique.

11096 Notre projet de recherche fondamentale et translationnelle porte sur l'immunothérapie, reconnue comme une des plus importantes avancées en oncologie. La stimulation de l'immunité a démontré une efficacité réelle mais seulement chez une proportion de patients. Parmi les stratégies prometteuses, nous nous intéressons en particulier à la stimulation d'une population de cellules immunitaires « tueuses de tumeurs », les lymphocytes T anti-tumeurs/cytotoxiques. Elles peuvent être stimulées à éliminer les tumeurs par des approches de vaccination et par blocage des points de contrôle immunitaire (ou ICB pour Immune Checkpoint Blockers = molécules exprimées en surface des lymphocytes qui les inhibent). Ces traitements représentent une opportunité sans précédent dans le traitement de certains cancers particulièrement résistants aux chimiothérapies (tels que par exemple les cancers de la tête et du cou (ORL). Les ICB montrent en clinique un intérêt certain, mais pour le moment, seule une proportion faible de patients répond aux ICB. Il est aujourd'hui crucial d'améliorer ces traitements en renforçant cette stratégie. Les objectifs majeurs de notre projet sont de : mettre en évidence des marqueurs de prédiction de l'effet des ICB (prédire leur utilité ou leur inefficacité pour les patients) ainsi que d'identifier des combinaisons d'ICB (synergisant avec une stratégie de vaccination) optimales pour différents cancers épithéliaux. Nous avons déjà obtenu des résultats préliminaires significatifs concernant les populations de lymphocytes T cytotoxiques dans les tumeurs chez les patients souffrant de cancer ORL mais aussi de cancer du col de l'utérus, des ovaires et des poumons. Nous avons effectué de nombreux tests *in vitro* sur des tissus humains (sang et tumeurs de patients et donneurs sains). Nos résultats démontrent que chez les patients, des populations particulières de lymphocytes T cytotoxiques, infiltrant les tumeurs et exprimant à leur surface une ou plusieurs molécules « points de contrôle » (nommés en particulier PD-1, TIGIT, TIM-3 et CTLA-4), semblent déterminantes pour le devenir des tumeurs. Leur implication dans les tumeurs pourrait être dépendante du type de cancer. L'investigation des mécanismes par lesquels ces lymphocytes T tuent les tumeurs ainsi que la validation de différentes combinaisons d'ICB et vaccins, spécifiques du type tumoral, ne peut se faire que dans un modèle d'étude reproduisant la complexité de la tumeur et de son microenvironnement (le microenvironnement est constitué par toutes les cellules et molécules entourant les cellules tumorales, y compris les lymphocytes T cytotoxiques). Ainsi pour les analyses précliniques (agissement des lymphocytes T au sein d'une tumeur, tests des combinaisons d'immunothérapies ICB et vaccins) que nous souhaitons effectuer, nous ne pouvons pas Remplacer le modèle d'étude *in vivo*, sur animal vivant.

Nous utiliserons des souris c57Black6 sauvages ou génétiquement modifiées comme modèle d'étude. Nous implanterons, dans différentes localisations anatomiques, les souris avec des cellules murines cancéreuses : soit sous la peau (procédure 1) / soit en profondeur, dans le site d'origine de la tumeur, en orthotopique (procédures 2 à 5). Afin de Réduire le nombre d'animaux en

expérimentation, une étude complète de la littérature actuelle concernant notre projet a été effectuée pour ne pas reproduire des résultats d'expériences déjà effectuées sur des animaux. Par ailleurs, nous utiliserons des tests statistiques (t-student, 2 way ANOVA et Mann Whitney) afin de valider nos résultats et limiter le nombre d'expériences à effectuer à 2, réduisant ainsi le nombre d'animaux. Le nombre total de souris utilisées sur 5 ans sera de 5812. Nous utiliserons 2552 souris pour les modèles sous la peau + 3260 souris pour les modèles orthotopiques. (8 animaux/groupe pour la procédure 1 et de 13 animaux/groupe pour les procédures 2 à 5 (suffisamment élevé pour études statistiques) – jusqu'à 7 conditions pour 1 expérience (compte tenu du nombre de souris par groupe il s'agira d'un nombre maximum de 91 souris par expérience) – les conditions (détaillées dans chaque paragraphe de procédures) comprennent différents types et doses de lignée cellulaires tumorales, +/- traité par injection d'anticorps (ICB), +/- traité par vaccin) – 2 expériences indépendantes – approximativement tous les mois pendant 5 ans). L'évolution du cancer dans les modèles précliniques (traités avec ICB/vaccin ou non) sera suivie par des mesures des tumeurs sous-cutanées (à l'aide d'un pied à coulisse), ainsi que de l'imagerie *in vivo* par bioluminescence pour les tumeurs localisées en profondeur dans l'animal. Afin de Raffiner la méthodologie utilisée, nous porterons une attention particulière à la souffrance et au stress des animaux ainsi qu'à l'atteinte du point limite. Le suivi de l'état général des souris sera effectué quotidiennement par le porteur de projet et du personnel formé. Pour diminuer la souffrance liée aux procédures expérimentales et au développement du cancer, un traitement analgésique sera donné dans l'eau de boisson. Pour diminuer le stress des animaux, les conditions d'hébergement seront améliorées avec l'ajout de complément alimentaire riche et sucré et des injections intrapéritonéales de sérum physiologique si une déshydratation est observée. L'angoisse et la souffrance seront évaluées par des observations comportementales. Si un changement chez l'animal traduit un point limite (isolement, problème de locomotion, poil hérissé, pelage mal soigné, perte de poids, déshydratation, atrophie musculaire, hypothermie, fréquence de respiration élevée, respiration difficile), l'animal sera euthanasié, en accord avec le vétérinaire désigné.

11097 Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde, aussi bien dans les pays développés que dans ceux en voie de développement. De plus, l'incidence de la mortalité cardiovasculaire augmente avec l'âge, du fait, au moins en partie, d'une augmentation de l'incidence des facteurs de risques cardiovasculaire avec l'âge.

Les maladies cardiovasculaires et leurs facteurs de risques sont associés précocement à un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire. Cette monocouche cellulaire située sur la face interne de l'ensemble des vaisseaux sanguins joue un rôle central dans le maintien d'un état vasculaire optimal, notamment grâce à la formation des facteurs vasoprotecteurs comme le monoxyde d'azote. La fonction endothéliale diminue avec l'âge, ce qui se traduit entre autre par une diminution de la dilatation artérielle dépendante de l'endothélium progressive au cours du vieillissement physiologique. La dysfonction endothéliale liée à l'âge, caractérisée par une diminution de la formation des facteurs vasoprotecteurs, va favoriser le développement des facteurs de risques cardiovasculaires pouvant à terme aboutir à des événements adverses tels que l'infarctus du myocarde ou l'AVC. La plupart des thérapeutiques actuelles pour la prise en charge des facteurs de risque cardiovasculaires n'ont peu ou pas d'effet sur la fonction endothéliale. Le développement d'une nouvelle approche visant à améliorer la fonction endothéliale présente donc un intérêt majeur.

Plusieurs études épidémiologiques et cliniques ont montré un intérêt des aliments riches en polyphénols dans la prévention secondaire des maladies cardiovasculaires. En effet, la consommation de thé, chocolat, vin rouge et de fruits et légumes a été associée à une diminution du risque cardiovasculaire dans diverses populations à risques. Parmi ces sources, certains fruits rouges très riches en anthocyanines, une classe de polyphénols responsables de la couleur de ces fruits, a montré une capacité à induire et à protéger la fonction endothéliale. Ainsi, la cassis a montré une forte capacité à induire la formation endothéliale de molécules protectrice.

Le but du présent projet est d'étudier l'effet de produits riches en anthocyanines issu de la cassis ou de fruits rouges sur la dysfonction endothéliale liée à l'âge. Pour ce faire, des rats âgés

respectivement de 12 semaines, de 7 mois et d'environ 20 mois recevront par voie orale les produits dilués dans l'eau de boisson pendant 21 jours. Après euthanasie, les tissus seront prélevés afin de déterminer la (dys)fonction endothéliale et les répercussions vasculaires dans divers organes (reins, cœur, poumons, aorte, artères et veines fémorales, etc.).

Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 140 rats du fait de l'application de la règle des 3R. Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait que le vieillissement physiologique est un processus complexe issu des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. Toutefois, la sélection des produits et l'identification de certains mécanismes moléculaires ont été faites à l'aide de méthode alternative. La réduction des effectifs est liée à l'utilisation de techniques et à une approche statistique adaptée (ANOVA et/ou test non-paramétriques). Enfin, le raffinement se fait par une prise en compte du bien-être animal (enrichissement du milieu et soins quotidiens aux animaux) et par le recours à des méthodes de mesures non-invasives (prise de pression par brassard à la queue).

11098 Le Syndrome de Down (DS) est la maladie génétique la plus courante, causée par la triplication du chromosome 21 humain. Le malade manifeste de nombreux symptômes, y compris des troubles cognitifs. Bien que l'espérance de vie des personnes atteintes augmente progressivement en raison de l'amélioration des services de santé dans la société, il n'existe aucun moyen d'intervention pour les déficits cognitifs.

Des études récentes de génétique ont révélé l'importance d'une région critique du syndrome de Down (DSCR) au sein du chromosome 21, dans de nombreux aspect du DS. En particulier, on sait qu'une certaine enzyme codée par ce DSCR est associée à une déficience cognitive, et on suppose que les traitements inhibant cette enzyme pourraient présenter un potentiel thérapeutique dans le DS.

Nous souhaitons utiliser un modèle animal, une souris génétiquement modifiée sur la région codant pour cette enzyme. Nous avons identifié un nouveau traitement qui agit sur cette enzyme et l'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de ce composé sur les déficits cognitifs dans un modèle murin de DS.

Actuellement, il n'y a pas de médicaments approuvés pour les déficits cognitifs du DS sur le marché et pas de traitement agissant sur cette enzyme aux stades des essais cliniques.

Grâce à ce projet, nous pourrions contribuer au développement d'une possible nouvelle thérapie pour les personnes atteintes de DS.

Avant cette expérience, la tolérance du composé a été validée par un partenaire externe en utilisant des souris de type sauvage, ce qui nous a indiqué les doses et la fréquence appropriées. Ainsi, nous ne prévoyons aucun effet secondaire indésirable dans cette expérience.

Remplacement : L'effet sur le comportement et les troubles cognitif ne peut pas être mesuré *in vitro*, c'est pourquoi les animaux doivent être utilisés dans ce projet.

Réduction : Des études similaires antérieures suggèrent qu'il faudrait au moins 16 animaux dans un groupe pour trouver les effets du traitement. De plus, nous aurons besoin d'au moins 4 groupes, pour déterminer la dose clinique prévue en fonction de l'efficacité et de l'innocuité. Cela porte le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet à 64 souris.

Raffinement : Pendant l'expérience sur les souris, l'environnement d'hébergement sera strictement contrôlé afin d'éviter tout stress sur les animaux. Aliment et boisson seront mis à disposition et les animaux seront surveillés quotidiennement afin de s'assurer de leur bon état de santé. Suite à l'administration du composé par gavage, une surveillance plus accrue sera effectuée durant les 2 heures suivant le protocole. En cas de fausse route durant le gavage, les animaux seront surveillés et mis à mort pour raison éthique, en cas de douleur non traitable. La lignée murine utilisée est couramment étudiée et aucun trouble lié à la mutation n'est attendu durant cette étude.

11099 La spasticité est un trouble de la motricité réflexe qui apparaît chez environ 70 % des personnes atteintes de lésions de la moelle épinière. Elle est caractérisée par des réflexes d'étirement du muscle hyperactif, des spasmes et des réactions exacerbées à des stimuli sensoriels normalement

anodins. Ainsi, les membres, pourtant partiellement ou totalement paralysés pour ce qui est des mouvements volontaires, sont parfois bloqués en flexion au point de raccourcir les articulations, et le simple glissement d'un vêtement ou d'un drap peut provoquer des spasmes. Il a été montré d'une part, que chez l'humain et/ou chez le rongeur, la spasticité était due à un déséquilibre de la balance excitation /inhibition qui contrôle le réseau locomoteur, et que d'autre part, elle était la conséquence d'une altération des processus qui normalement régulent les réflexes.

Le modèle de lésion de la moelle épinière, chez le rat nouveau-né, a mis en évidence une hyperexcitabilité du réseau locomoteur sous lésionnel similaire à la spasticité observée chez le rat adulte. C'est le seul modèle qui permet, à l'heure actuelle, d'approfondir les connaissances sur les mécanismes sous-jacents responsables de l'hyperexcitabilité, car la moelle épinière chez le jeune rongeur peut être maintenue en vie « *ex vivo* » pendant plusieurs heures pour des enregistrements électrophysiologiques intracellulaires.

2 espèces (rat et souris) sont utilisées dans notre étude car il existe des différences dans leur récupération fonctionnelle locomotrice. Il est donc important de déterminer si les mêmes mécanismes sont impliqués dans l'apparition de la spasticité et évaluer l'efficacité d'un même traitement sur les 2 espèces. Le fait de faire ressortir des mécanismes communs sur lesquels peut agir, de façon efficace, des éventuels « candidats médicaments », renforce l'idée que ces mêmes molécules auront un fort potentiel thérapeutique sur d'autres mammifères comme l'humain. De plus, les souris transgéniques nous donneront la possibilité d'affiner, dans un proche avenir, nos travaux de recherche sur des sous populations de neurones et d'interneurones identifiées. Il serait également envisageable, à plus long terme, si les conditions décrites ci-dessus sont réunies, de remplacer le modèle rat, historiquement utilisé dans notre laboratoire, par le modèle souris.

Dans notre projet, nous ferons appel à 5 procédures expérimentales qui sont justifiées de la manière suivante : l'administration en aiguë ou en chronique pendant 7 jours, de molécules pharmacologiques, ou l'inhibition spécifiques de protéines cibles via des adénovirus, seront évaluées grâce à des enregistrements électromyographiques, et des études comportementales sur des animaux lésés à la naissance et maintenus en vie, pour certains jusqu'à la fin de la première semaine post-natale et pour d'autres jusqu'à la 2ème semaine post-natale. Ces évaluations seront complétées, après la mise à mort de l'animal et prélèvement de la moelle épinière, d'études biochimiques, immuno-histochimiques et électrophysiologiques.

L'ensemble de ce projet nécessitera un nombre total d'animaux de 2460 rongeurs, soit 1217 rats et 1243 souris. Pour répondre à la règle des 3R, i) « Réduction » du nombre d'animaux, certains seront utilisés dans plusieurs protocoles expérimentaux. Le nombre de rongeurs par groupe expérimental sera limité à son strict minimum compte tenu des contraintes de chaque technique expérimentale, avec des analyses statistiques adaptées. ii) « Raffinement ». Nous limiterons notre étude aux 2 premières semaines post-lésionnelles, car au-delà les enregistrements électrophysiologiques « *ex vivo* » ne sont plus possibles. Les animaux, une fois opérés, sont maintenus en fratrie et ramenés à la mère. Une observation journalière permettra de définir par un score, les points limites qui sont notamment la perte de poids, le comportement, la température corporelle. La gestion de la douleur se fera par l'ajout d'un antalgique dans l'eau de boisson de la mère afin que le médicament passe dans le lait maternel. iii) « Remplacement ». Notre projet est basé sur la compréhension de la physiopathologie du système moteur, aussi le modèle animal est indispensable dans notre champ d'étude qu'est la spasticité. Cependant, une partie de nos travaux est aussi réalisée sur lignée cellulaire et par modélisation, ce qui permet de diminuer le nombre d'animaux employés.

11100 La spasticité est un trouble de la motricité réflexe qui apparaît chez environ 70 % des personnes atteintes de lésions de la moelle épinière, mais aussi après certains traumatismes crâniens et maladies neurodégénératives telles que la sclérose en plaque. Elle est caractérisée par des réflexes tendineux (réflexe d'étirement du muscle) hyperactifs, des spasmes et des réactions exacerbées à des stimuli sensoriels normalement anodins. Ainsi, les membres, pourtant partiellement ou totalement paralysés pour ce qui est des mouvements volontaires, sont parfois bloqués en flexion au point de raccourcir les articulations, et le simple glissement d'un vêtement ou d'un drap peut provoquer des spasmes et donc d'importants troubles du sommeil, ou des chutes du fauteuil roulant.

Il a été montré chez l'homme et/ou chez le rongeur que la spasticité était due à un déséquilibre de la balance excitation /inhibition qui contrôle le réseau locomoteur (composé de neurones et de cellules gliales), et d'autre part à une altération des processus qui régulent les réflexes spinaux.

Dans le laboratoire, nous avons montré que ce déséquilibre de la balance excitation /inhibition après une lésion de moelle épinière était dû à (i) une hyperexcitabilité liée à une perturbation des canaux sodiques et (ii) une désinhibition liée à une baisse de co-transporteurs chloridriques au niveau neuronal provoquant l'apparition de spasmes chez le rongeur. Toutefois, les mécanismes liés à ce déséquilibre ne sont pas entièrement connus.

Dans ce présent projet, nous poursuivrons donc notre investigation sur les mécanismes responsables de l'hyperexcitabilité du réseau moteur après une lésion de moelle épinière pour aboutir à des pistes thérapeutiques. Cette étude nécessitera 1184 rats Wistar Han et 455 souris C57BL/6J soit un total de 1639 animaux sur 5 ans. Pour répondre à la règle des 3R, i) « Réduction » du nombre d'animaux, certains seront utilisés dans différents protocoles expérimentaux comme décrits dans l'annexe. Ce qui nous permettra d'économiser 34 % d'animaux. Le nombre de rongeurs par groupe expérimental sera limité à son strict minimum compte tenu des contraintes de chaque technique expérimentale, avec des analyses statistiques adaptées. ii) « Raffinement » Nous limiterons notre étude à un délai post-lésionnel de 2 mois, que nous avons établi au regard de la littérature dans le domaine. Une observation régulière des animaux permettra de définir par un score (voir grille Morton et Griffith) les points limites qui sont notamment la perte de poids, le comportement, la température corporelle. Une médication adaptée (anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires, antibiotiques) sera mise en œuvre pour éviter toute douleur ou souffrance des animaux et pour traiter les infections urinaires qui sont un des effets secondaires majeurs des lésions médullaires chez le rongeur. Les animaux seront hébergés par 2 ou 3 par cage dans un environnement enrichi boule de papier, morceau de bois à ronger, tube de plexiglass pour favoriser le bien-être animal. iii) « Remplacement » Notre projet est basé sur la compréhension de la physiopathologie du système moteur, aussi le modèle animal est indispensable dans notre champ d'étude qu'est la spasticité. Cependant une partie de nos travaux est aussi réalisée sur lignée cellulaire et par modélisation, ce qui a permis de diminuer le nombre d'animaux employés.

11101 Les cancers du sein représentent la deuxième cause de décès par cancer chez la femme, principalement en raison des métastases qu'ils induisent. Ces cancers constituent un ensemble hétérogène parmi lesquels ceux dits « triple négatif », sont les plus agressifs. Les cancers du sein triple-négatif (CSTNs) représentent 20% des cancers du sein, et les patientes atteintes de CSTN ont un taux de récurrence plus élevé et un pronostic plus faible que les patientes atteintes d'autres types de cancers du sein. Il est donc essentiel de développer de nouveaux traitements efficaces pour ce type de cancer très agressif, d'autant plus qu'il affecte en majorité des patientes jeunes (moins de 50 ans).

Le Re-disénoéthér est une molécule de synthèse pour laquelle il a été mis en évidence des propriétés antiprolifératives dans les conditions de la culture *in vitro* et, *in vivo* dans un modèle préclinique de cancer du sein chez la souris immunodéprimée. Un des mécanismes impliqués dans l'effet anti-tumoral de cette molécule consisterait à induire une production excessive de dérivés réactifs de l'oxygène (en anglais Reactive Oxygen Species, ROS) qui entraînerait sélectivement la mort des cellules cancéreuses, plus vulnérables vis à vis de ce stress que les cellules non cancéreuses.

L'objectif de notre étude est de confirmer l'effet antitumoral du Re-disénoéthér dans un modèle syngénique orthotopique de tumeurs mammaires chez la souris immunocompétente, c'est à dire des conditions plus proches du contexte physiopathologique, et de rechercher une corrélation avec les marqueurs du stress oxydatif.

D'un point de vue expérimental, nous proposons d'utiliser les cellules de la lignée 4T1 qui seront injectées dans la glande mammaire des souris Balb/c. Le traitement sera donné par gavage journalier des souris.

En termes de remplacement, il n'y a pas actuellement de méthodes alternatives *in vitro* permettant de reproduire l'environnement immunitaire d'une tumeur. Cette composante est pourtant essentielle sachant d'une part, que les ROS peuvent moduler les propriétés des cellules immunitaires et d'autre part que les cellules immunitaires interviennent dans le développement tumoral.

En termes de réduction, le nombre de souris a été calculé pour limiter l'utilisation des animaux tout en assurant des résultats statistiquement fiables. Le projet nécessitera 136 souris

En termes de raffinement, tous les animaux utilisés seront manipulés le plus paisiblement possible et hébergés par 4 dans des cages enrichies avec un igloo et des tiges/carrés de coton afin de limiter au maximum leur stress. Le suivi des animaux sera effectué conformément à une grille d'évaluation afin de 1- détecter tous signes de souffrance/inconfort et 2- mettre en place des traitements/solutions adaptés aux problèmes identifiés.

11102 Ce projet vise à étudier la capacité des agents chimiothérapeutiques à induire une réaction immunitaire spécifique de la tumeur (immunité antitumorale). Seule une poignée d'agents chimiothérapeutiques actuellement utilisés sont capables d'induire une immunité antitumorale efficace. Il semble donc important de pouvoir identifier de nouvelles approches (en combinant divers molécules/traitements par exemple) afin non seulement d'éliminer les cellules tumorales mais aussi d'éduquer le système immunitaire à reconnaître et à détruire les cellules tumorales restantes (limitant ainsi la résurgence de la pathologie). Dans ce projet nous voulons déterminer si nos nouveaux agents chimiothérapeutiques dérivés d'antidiabétiques, qui ont déjà la capacité de détruire les cellules tumorales, permettent la mise en place d'une immunité antitumorale contre les cancers du côlon et les mélanomes, deux cancers dévastateurs.

Conformément aux exigences de remplacement, réduction et raffinement, les expériences *in vivo* sont précédées de multiples expériences et mises au point *in vitro* ce qui permettra de n'utiliser que le nombre de souris strictement nécessaire. De plus une grande importance sera accordée au bien-être des animaux avec un suivi régulier permettant de détecter tout signe de souffrance, détresse de l'animal et ainsi la prise immédiate des mesures adéquates. La notion d'enrichissement du milieu des rongeurs utilisés est familière aux demandeurs. En effet tous les participants ont beaucoup d'expérience dans le domaine de l'expérimentation animale et sont tous dûment qualifiés et diplômés dans le domaine. Ce projet prévoit l'utilisation de 1290 souris.

11103 Le paludisme reste à ce jour une des maladies infectieuses la plus mortelle. Malgré des avancées majeures ces dernières années, cette maladie parasitaire a encore l'année dernière provoqué la mort de 425.000 personnes, principalement des enfants en Afrique subsaharienne. La stratégie mondiale actuelle est l'éradication du paludisme. Cependant comme pour toutes les maladies infectieuses, la résistance des parasites aux traitements actuels est un des obstacles majeurs.

Les symptômes du paludisme sont causés par la multiplication répétitive d'un parasite, *Plasmodium falciparum*, dans les globules rouges. Notre approche de lutte contre le paludisme est nouvelle et innovante. Nous cibons la cellule hôte du parasite, le globule rouge. L'avantage majeur de notre approche devrait être que nous nous affranchissons du développement des résistances car nous ne cibons pas le parasite directement. Nous allons donc inaugurer une toute nouvelle façon de lutter contre ce parasite. De plus, les molécules développées dans ce projet pourraient avoir un intérêt pour le traitement ou des études plus approfondies des maladies du sang, souvent rares et sans traitement actuel.

Notre recherche de nouveaux antipaludiques contre le parasite humain *Plasmodium falciparum* a débuté au laboratoire avec des tests sur des parasites cultivés dans du sang humain en boîte de culture. Des tests, entre autres avec des cellules humaines en culture, nous permettent d'identifier les molécules avec les moins d'effets toxiques et de réduire drastiquement le nombre de molécules qui doivent ensuite être testées dans un modèle animal. Pour le paludisme ces tests sont réalisés en routine chez la souris infectée par des *Plasmodium* spécifiques des souris.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés (règle des 3R), seuls les molécules ayant une bonne activité contre le parasite et une faible toxicité pour les cellules humaines seront testées

chez la souris infectée. Nous analysons ensuite 4 doses, et utilisons 3 souris par dose et 3 souris comme contrôles. De plus des souris sont nécessaires pour l'entretien des Plasmodium de souris qui ne peuvent pas être propagés dans des boîtes de culture.

Les procédures concernent principalement les injections de sang parasité ou de molécules à tester et le prélèvement de sang (sous forme de goutte par le bout de la queue). Ces procédures ne génèrent qu'une légère douleur et peu de stress lié aux manipulations des souris et des objets anti-stress sont ajoutés dans les cages. Les souris sont surveillées tous les jours.

L'objet de l'étude étant l'évolution de l'infection par Plasmodium, aucun médicament luttant contre l'infection ou pouvant interagir avec l'évolution de l'infection (antidouleur, etc...), ne peuvent être utilisés. Pour cette raison la procédure est de classe sévère. Nos protocoles sont réalisés juste après l'infection et se terminent avant l'apparition des signes de souffrance. Cependant, si des animaux présentent des signes de souffrances, ils seront euthanasiés.

Ce projet est planifié pour une durée de 5 ans avec l'utilisation d'environ 600 souris par an, donc un maximum de 2700 animaux sur la durée du projet.

11104 La consommation de cholestérol et de fer héminique (dans la viande rouge) pourraient jouer un rôle important dans le cancer du sein. Pourtant, le rôle de ces composants alimentaires n'a pas été analysé en détail. En particulier, leur interaction et leurs rôles dans la promotion/progression tumorale via la production de lipides oxydés sont peu connus. Le but de ce projet sera de déterminer les mécanismes par lesquels la viande rouge et ses composants (cholestérol et fer héminique) peuvent favoriser et aggraver le développement tumoral dans un modèle murin de cancer du sein. Nous examinerons le rôle de la viande rouge dans le métabolisme du cholestérol pour déterminer s'il existe un effet synergique entre la viande rouge et le métabolisme des stérols pendant le développement du cancer du sein.

Ce projet nous donnera aussi l'occasion de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement du cancer. 2050 souris seront utilisées dans ce projet. Ce nombre représente le nombre minimum d'animaux requis pour observer des différences significatives entre les différents groupes expérimentaux.

La stratégie expérimentale du projet respecte la règle » 3R : remplacement, réduction, raffinement » :

Remplacement : Il est important de noter qu'il n'y a pas de modèle *in vitro* capable de modéliser ce type de cancer. Nous avons suivi la règle de réduction du nombre d'animaux (un nombre plus petit d'animaux compromettrait fortement la validité statistique des résultats).

Raffinement : le développement des tumeurs sera limité et les animaux portant des tumeurs seront particulièrement suivis afin d'éviter toute souffrance. Les souris seront placées sous anesthésie générale pour limiter la douleur lorsque la procédure subie le nécessitera. Les animaux seront hébergés dans des cages dont l'environnement sera enrichi (5 animaux par cage). Les souris seront suivies quotidiennement afin de vérifier leur état de santé et leur bien-être.

11105 Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un organisme modèle dans les domaines de la biologie du développement et de la génétique. Les embryons et les larves de poisson zèbre sont transparents ce qui permet l'observation directe et non invasive des organes au cours du développement. Le génome du poisson zèbre est connu ce qui permet de réaliser des études génétiques. Des lignées transgéniques ou mutantes pour un gène d'intérêt peuvent être établies.

Notre étude des gènes de maladies génétiques implique d'observer l'effet des mutations à l'échelle de l'organisme entier et l'utilisation de l'animal ne peut donc être remplacée par une technique *in vitro*. L'objet de ce projet est de prélever l'extrémité de la nageoire caudale afin d'identifier quels animaux sont porteurs de la mutation génétique d'intérêt.

Réduction : L'établissement de lignées génétiquement modifiées et le maintien de lignées obtenues via les centres de ressource poisson zèbre nécessite la génération d'un effectif maximal de de 1950

sur la durée totale du projet sachant que quatre lignées seront générées et trois maintenues sur la durée totale du projet.

Raffinement : Afin de limiter le stress, la procédure de biopsie est réalisée sous anesthésie générale même si aucun dommage n'est attendu. En effet, le comportement des poissons après biopsie est normal et la régénération de la nageoire caudale est complète en une dizaine de jours.

11106 Nous souhaitons évaluer le potentiel thérapeutique d'anticorps monoclonaux dans un modèle de greffe contre l'hôte (GVHD) xénogénique sur des souris NSG. Ce modèle sera induit par injection des cellules mononuclées de sang périphérique xénoréactives (PBMC). Ces anticorps monoclonaux ciblent un récepteur membranaire exprimé sur les leucocytes humains. Il a été démontré que ce récepteur est un marqueur des lymphocytes T activés et aussi associé aux pathologies inflammatoires. Actuellement des anticorps ciblant ce récepteur sont utilisés en clinique pour la thérapie active sur le système immunitaire humain notamment en thérapie anti-cancéreuse. Cependant, des améliorations sont nécessaires. Des nouveaux anticorps monoclonaux ont été générés et validés *in vitro* qui ont permis de sélectionner 4 candidats mais des tests *in vivo* sont nécessaires. Pour pouvoir envisager des essais cliniques nous devons tester ces anticorps dans des modèles *in vivo* dans les contextes d'une GVHD.

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit :

- Remplacer : des études fonctionnelles ont été réalisées *in vitro* à partir de cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études *in vivo*. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immuno-régulatrice de la molécule dans un modèle *in vivo* proche de l'Homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique est le modèle de souris dites « humanisées ».

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 20, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les souris seront divisées en 5 groupes (20 souris/groupe). Le groupe témoin recevra un isotype contrôle, les autres groupes seront traités avec des anticorps humains. Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total des animaux est de 100.

- Raffiner : Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. L'euthanasie des animaux sera effectuée par inhalation d'isoflurane en surdose suivie par une dislocation cervicale. Chaque semaine, un prélèvement sanguin sera réalisé sur animaux anesthésiés avec un mélange gazeux (isoflurane/oxygène) et surveillés jusqu'à leur réveil complet.

Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids et le score clinique pour diagnostiquer le développement de la GVHD. Des prélèvements sanguins seront effectués une fois par semaine pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG. Tous les animaux traités avec les molécules et ceux du groupe contrôle seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de GVHD, et par immuno-histologie pour étudier les conséquences de la migration des cellules injectées.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique des anticorps testés sur les réponses immunes intervenant dans des contextes de GVHD et de mieux comprendre ses mécanismes d'action par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées versus souris contrôles.

La validation de ces molécules dans ce modèle préclinique de souris humanisée est une étape indispensable pour évaluer l'efficacité de ces anticorps avant de passer aux tests cliniques.

11107 L'alimentation des vaches laitières conduit aujourd'hui à utiliser des quantités importantes (près de 3 millions de tonnes en France chaque année) de compléments protéiques comme les tourteaux d'oléagineux ou de protéagineux. Ces ressources sont potentiellement en compétition avec

l'alimentation humaine et la réduction de leur utilisation est un enjeu de durabilité de l'élevage. Les études sur l'environnement montrent également tout l'intérêt qu'il y a à réduire leur utilisation (moins de rejets vers l'air, l'eau et les sols) et à accroître l'autonomie protéique des territoires d'élevage. Ce travail expérimental a donc pour objectif d'évaluer dans quelle mesure les nouvelles possibilités de l'alimentation de précision permettraient d'économiser des ressources protéiques. Notre hypothèse est qu'une complémentation individuelle en protéines des animaux sur la base de leur efficacité (i.e. leur propre capacité à utiliser au mieux ces protéines pour produire du lait) est une méthode très performante d'optimisation de l'utilisation des protéines. Cette complémentation protéique individualisée contribuera ainsi à améliorer la valeur alimentaire des rations sans risques pour l'animal ni pour le consommateur tout en réduisant l'utilisation de ces intrants et les rejets azotés associés, en particulier dans l'urine, réduisant ainsi les risques de pertes vers l'air (ammoniac et protoxyde d'azote) et vers l'eau (nitrates).

Pour mener ces travaux, des essais d'alimentation seront conduits sur 48 vaches laitières en production, représentatives de celles rencontrées dans les élevages aujourd'hui. Ces travaux nécessitent des expérimentations *in vivo* car les réponses biologiques ne peuvent être simulées précisément pour l'instant. Les résultats obtenus (issus de ce projet et d'études passées) contribueront ainsi à développer les modèles de prévision nécessaires au principe de "remplacement" des 3R. Les essais seront menés en continu pour pouvoir évaluer les impacts à moyen terme de ces stratégies avec trois lots de vaches équilibrés suite à une période pré-expérimentale. Celle-ci fournira également des covariables permettant d'augmenter la puissance statistique et permettant de réduire le plus possible le nombre d'animaux pour montrer l'efficacité des traitements compte tenu des réponses biologiques estimées. Le nombre de prélèvements sur les animaux sera également réduit au minimum (une prise de sang tous les 15 jours). Ces deux derniers points permettront de répondre au principe de "réduction" des 3R. Enfin, une attention particulière sera portée au bien-être des animaux suivis (ingestion, état de santé général), et toute indication de mal-être des animaux conduira à les sortir de l'expérimentation, en accord avec le vétérinaire, respectant ainsi le principe de "raffinement" des 3R. Cette expérimentation se déroulera dans des conditions proches de celles d'un élevage classique, contribuant à élaborer des modèles mathématiques d'alimentation fiables pour transposer ces résultats expérimentaux dans des pratiques d'élevages laitiers et inciter à réduire l'utilisation des protéines.

11108 Dans le cerveau, l'information est transmise de neurones en neurones au niveau d'une structure spécialisée, la synapse. Afin que cette transmission ait lieu de manière efficace et adaptée, il est important de considérer le rôle d'une autre cellule, l'astrocyte. En effet, cette cellule, communément appelée cellule gliale régule l'efficacité avec laquelle les neurones communiquent. Pour se faire, tout comme les neurones, les astrocytes libèrent des substances actives, appelées gliotransmetteurs, comme la D-sérine.

Dans l'hippocampe, une structure jouant un rôle clé dans la mémoire et l'apprentissage, les astrocytes, en libérant la D-sérine, contrôlent à l'échelle cellulaire la mémoire synaptique. Afin que la D-sérine soit libérée au bon endroit, des données dans la littérature suggèrent l'implication d'un récepteur.

Le but de ce projet est de mieux comprendre comment la mémoire se forme en identifiant si le récepteur identifié est à l'origine de la disponibilité en D-sérine à la synapse, nécessaire pour la mémoire.

L'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation de 209 souris C57BL/6J, dont une lignée transgénique non dommageable, de même fond génétique. Il n'existe actuellement pas de modèle *in vitro* et donc de méthode alternative permettant de REMPLACER les animaux. Afin de respecter la règle des 3R, nous avons REDUIT à 209 le nombre d'animaux que nous prévoyons d'utiliser pour une période de 5 ans. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable. Des mesures de RAFFINEMENT seront mises en place durant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien par du personnel qualifié) Enfin, des points-limites ont été établis

entraînant une prise en charge de l'animal afin d'anticiper toute souffrance et réduire au mieux l'inconfort des animaux (anesthésie, analgésie, gel oculaire, tapis chauffant).

11109 Les arbovirus (virus transmis par les insectes), par leur diversité, leur potentiel d'émergence ou d'extension à de nouveaux territoires et leur expansion croissante à l'échelle mondiale, ont un impact important en santé publique. Afin d'être en mesure de surveiller la circulation de ces virus, et de contribuer au développement et à la validation d'outils de détection de ces virus et de diagnostic des infections qu'ils engendrent, il est nécessaire de disposer de capacités de production d'antigènes viraux et d'anticorps spécifiques variés, de façon réactive et en quantité significative. L'autonomie et la réactivité permises par la possibilité pour le laboratoire demandeur de produire des réactifs spécifiques (antigènes viraux et ascites hyperimmunes) sont particulièrement importantes pour le développement de nouvelles techniques de détection que ce soit vis-à-vis d'arbovirus émergents ou susceptibles de le devenir ou encore d'arbovirus d'importance locale voire régionale dont l'importance épidémiologique reste mal connue du fait de l'absence d'outils commerciaux.

La production de virus sur cerveaux de souriceaux nouveau-nés permet d'obtenir des suspensions d'antigènes viraux de titre élevé, adaptées pour la réalisation de tests de diagnostic sérologique spécifiques. Utilisés dans des réactions de type ELISA, ces antigènes permettent la détection dans le sérum des patients d'anticorps spécifiques produits en réaction à l'infection par le virus correspondant. Pour répondre aux urgences sanitaires, les besoins maximaux sont estimés à 100 portées de souriceaux par an, soit 500 portées (5000 souriceaux) et 500 femelles sur 5 ans. Ils pourront être moindres, selon le contexte sanitaire. La sévérité de cette production (P1) est de classe sévère

La production d'ascites hyperimmunes sur souris permet la détection des arbovirus correspondants par ImmunoFluorescence Indirecte sur culture cellulaire après inoculation de prélèvements de patients ou la recherche dans des essais de type MAC-ELISA, d'IgM spécifiques témoignant dans le sérum de patients de leur réponse à l'infection virale ciblée. Le recours à un processus d'immunisation de souris pour l'obtention d'ascites hyperimmunes spécifiques reste aujourd'hui encore obligatoire puisque, pour de nombreux arbovirus, il n'y a pas de technique diagnostique alternative. Cette production comprend 2 procédures : l'une de sévérité modérée pour la production des cellules sarcomiques nécessaire à la réalisation des ascites (P2), et une procédure sévère qui est la génération d'ascite par les souris (P3). Cette dernière procédure étant de classe de sévérité « sévère », le but est de réduire au maximum le recours à ces productions d'ascites hyperimmunes en les remplaçant pour toutes les utilisations où cela est possible, par des anticorps commerciaux, des anticorps monoclonaux dès lors que leur spécificité permet de détecter les virus et/ou souches virales d'intérêt ou par des techniques de détection moléculaire. Néanmoins la validation de nouveaux outils prendra du temps, tandis que pour de nombreux arbovirus il n'existe aucune alternative commerciale. Les besoins maximaux (en cas d'urgences sanitaires), objet de la demande, sont estimés à 38 souris adultes par an, soit 190 sur la durée du projet (40 pour la procédure P2 et 150 pour la procédure P3). Ils pourront être moindres, selon le contexte sanitaire.

Les procédures sont adaptées pour réduire au maximum inconfort et douleur animale : utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques à toutes les étapes où ils sont nécessaires, surveillance renforcée des animaux, mise à mort des souris pour la récolte des ascites hyperimmunes.

11110 L'objectif du projet est de comprendre sur des modèles expérimentaux chez le rongeur (souris) les propriétés des réseaux neuronaux qui sous-tendent l'encodage, le traitement et le stockage des informations ainsi que les déficits cognitifs associés aux principales pathologies cérébrales (maladies neurodéveloppementales, neurodégénératives, épilepsie) aux conséquences dévastatrices. Les réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire, et qui sont affectés dans ces pathologies, impliquent des interactions entre différentes régions cérébrales, et entre des types distincts de neurones. Dans ce projet, nous allons utiliser des techniques de biologie moléculaire (opto- et pharmaco-génétique) permettant de manipuler l'activité de populations neuronales

spécifiques afin de mieux comprendre comment ils contrôlent les circuits impliqués dans la mémoire.

Les avantages escomptés sont une meilleure compréhension du fonctionnement cérébral et de ses pathologies (neurodéveloppementales, neurodégénératives, épilepsie), ce qui représente un intérêt sociétal considérable.

Les dommages escomptés sont d'une façon générale l'élevage et le sacrifice prématuré de rats et de souris à des fins de recherche, c'est à dire dans des conditions artificielles et monotones par rapport à une vie sauvage ou domestique, et parfois en cage individuelle pendant la période expérimentale, entraînant un déficit de relations sociales chez ces espèces grégaires. Le projet implique également des interventions chirurgicales (craniotomie) afin d'injecter des constructions virales, avec l'inconfort associé au réveil post-chirurgical et un risque infectieux.

Ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement.

L'étude des propriétés des circuits neuronaux impliqués dans la cognition nécessite l'observation et la manipulation de systèmes neuronaux intacts, et ne peut donc se faire que sur l'animal vivant. Il est en effet à ce stade de nos connaissances impossible de modéliser de façon réaliste le fonctionnement cognitif *in vitro* ou *in silico*. Nous avons opté pour l'utilisation du rat et de la souris car ces rongeurs présentent le meilleur équilibre entre les bénéfices (accessibilité expérimentale et pertinence par rapport aux pathologies chez l'homme) et les dommages escomptés (souffrance liées aux conditions d'élevage ou d'expérimentation).

Le nombre d'animaux nécessaires pour garantir un pouvoir statistique suffisant pour chacune de nos expériences est ici de 400 rats et 460 souris, répartis sur une période de projet de 5 années.

Les animaux utilisés sont des rats et des souris, dont certaines de lignées transgéniques qui expriment un marqueur moléculaire permettant de cibler spécifiquement les neurones du type d'intérêt, et de leur faire exprimer des molécules nous permettant de contrôler expérimentalement leur niveau d'activité. Il devient ainsi possible de tester des hypothèses quant au rôle de ces neurones dans le circuit de façon causale (que se passe-t-il quand ces neurones sont expérimentalement activés ou au contraire bloqués) et non plus seulement corrélative (quand ces neurones sont-ils actifs). Les marqueurs moléculaires spécifiques des lignées utilisées n'ont pas d'incidence sur la physiologie, en dehors des strictes périodes de manipulation de l'activité des neurones, et le phénotype des animaux est donc sans conséquence sur leur bien-être. Des éléments de distraction (les animaux sont élevés en cages collectives, autant que possible, selon des normes qui respectent leur besoin d'interactions sociales, et le milieu est enrichi avec du matériel de construction du nid) sont introduits dans les cages d'élevage pour pallier la monotonie des conditions d'élevage en laboratoire. Pour prévenir, détecter et corriger les conditions de mal-être éventuel, les animaux sont suivis de façon très régulière par du personnel spécialisé, formé et sensibilisé au bien-être animal.

Afin de minimiser la douleur, les interventions chirurgicales sont effectuées sous traitement anesthésique local, général et antalgique. La température corporelle est maintenue pendant toute la chirurgie et lors du réveil grâce à une couverture chauffante. Un gel protecteur évite l'assèchement de l'œil. A l'issue de l'opération, l'évolution de la cicatrisation est suivie et l'animal est surveillé quotidiennement pendant plusieurs jours. Les animaux sont ensuite habitués progressivement à la condition expérimentale (pas plus de quelques minutes par jour au départ), toujours associée à un renforcement positif (friandise pendant ou après la session). Pendant toute la période expérimentale, des points limites sont fixés pour minimiser la souffrance et l'angoisse. Si l'animal présente des signes visibles de mauvaise santé ou d'inconfort (immobilité de l'animal, état de détérioration de sa fourrure (absence de toilettage par exemple), absence de la réaction comportementale aux stimuli externes, agressivité anormale lors de la manipulation, tremblements, attitude voutée ou poils hérissés, perte de poids de 20% ou plus par rapport au poids avant expérience / chirurgie), la première mesure sera l'intervention du vétérinaire et l'isolement de l'animal. En l'absence d'amélioration de l'état de l'animal dans les 24h après le traitement éventuel décidé par le vétérinaire au vu des symptômes, l'animal est euthanasié pour éviter toute souffrance supplémentaire.

11111 La neuropathie est une des complications les plus fréquentes du diabète et, entre 8 et 65% des patients diabétiques présentent des symptômes douloureux associés à leur neuropathie. Ces douleurs, souvent invalidantes, ont un retentissement négatif sur la qualité de vie des patients et les traitements de référence (antiépileptiques et antidépresseurs) ont une efficacité limitée. L'utilisation du modèle du rat rendu diabétique par la streptozocine (STZ) qui reproduit la plupart des symptômes douloureux de la neuropathie diabétique observés en clinique, devrait conduire à des progrès thérapeutiques.

L'objectif principal de ce projet est d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'améliorer les traitements des douleurs neuropathiques. Nous proposons de tester le pouvoir antalgique de ligands de récepteurs impliqués dans l'étiopathogénie de la douleur neuropathique diabétique chez le rat.

Pour ce projet, le recours à l'animal présentant une douleur neuropathique d'étiologie métabolique est indispensable ; son utilisation sera limitée dans le temps (21 jours maximum) et interrompue si l'animal présente des signes d'inconfort ou de douleur perturbant son activité. L'effectif maximal calculé pour atteindre les objectifs est de 200 rats, il a été déterminé par la puissance des tests statistiques et la grandeur de la variation attendue. Notre projet respecte donc la règle des 3R.

11112 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires, l'innocuité et la tolérance des candidats médicaments doivent être évaluées pour déterminer la sécurité d'utilisation du produit chez l'espèce cible.

L'objectif du projet (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de tolérance chez l'animal de rente dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs, pour pouvoir établir le profil de tolérance du produit en développement. Plusieurs études de tolérance pourront être requises pour établir le profil de tolérance du produit et définir une dose, selon l'état d'avancement du développement du produit.

L'espèce cible du présent projet est l'animal de rente (bovin, porcin, ovin, caprin), jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études de tolérance, en administration unique ou répétée. Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit et la finalité de l'étude (exemples : étude pilote, réglementaire), le nombre de voies d'administration à tester, et dans le respect des textes réglementaires correspondants en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 800 animaux pour chacune des espèces cibles (bovin, porcin, ovin, caprin).

Le projet est conçu pour être répété en totalité ou partiellement. Il vise à caractériser la tolérance de nouveaux produits chez l'animal de rente, sans compromettre l'atteinte de l'objectif et dans le respect du bien-être animal et des principes de remplacement, de réduction et de raffinement, et d'indicateurs précoces, dans une expérimentation animale, de toute souffrance ; ces derniers sont définis selon une grille d'évaluation élaborée (et régulièrement revue) conjointement par la structure chargée du bien-être animal, le comité d'éthique et les expérimentateurs.

- les études réglementaires sont réalisées séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés et en préservant leur bien-être,

- tous les traitements, prélèvements et euthanasies seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU,

- depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,

- les points limites sont tout changement du comportement ou de l'aspect de l'animal, dont perte d'appétit, perte de poids, altération de la respiration, excrétion anormale, dans les jours suivant le(s) traitement(s) ; toute observation laissant présager un début de mal-être, est immédiatement

signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour protéger l'animal.

Ce projet couvre également

- le recueil de tissus ou de matrices dans le but de préparer des matrices biologiques témoins requises pour les activités de bio-analyse
- l'acquisition et le maintien des compétences techniques par le personnel assurant l'application des procédures expérimentales aux animaux, le développement de techniques et/ou méthodes, et/ou la génération de données historiques.

11113 L'objectif du projet est de comprendre sur des modèles expérimentaux chez le rongeur (rat, souris) les propriétés des réseaux neuronaux qui sous-tendent l'encodage, le traitement et le stockage des informations ainsi que les déficits cognitifs associés aux principales pathologies cérébrales (maladies neurodéveloppementales, neurodégénératives, épilepsie) aux conséquences dévastatrices. Les réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire, et qui sont affectés dans ces pathologies, impliquent des interactions entre des types distincts de neurones. Dans ce projet, nous allons utiliser des techniques de biologie moléculaire (optogénétique) permettant de manipuler l'activité de populations neuronales spécifiques afin de mieux comprendre comment ils contrôlent les circuits impliqués dans la mémoire.

Les avantages escomptés sont une meilleure compréhension du fonctionnement cérébral et de ses pathologies (neurodéveloppementales, neurodégénératives, épilepsie), ce qui représente un intérêt sociétal considérable.

Les dommages escomptés sont d'une façon générale l'élevage et le sacrifice prématuré de rats et de souris à des fins de recherche, c'est à dire dans des conditions artificielles et monotones par rapport à une vie sauvage ou domestique, et parfois en cage individuelle pendant la période expérimentale, entraînant un déficit de relations sociales chez ces espèces grégaires. Le projet implique également des interventions chirurgicales (craniotomie) afin d'injecter des constructions virales, avec l'inconfort associé au réveil post-chirurgical et un risque infectieux.

Ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement.

L'étude des propriétés des circuits neuronaux impliqués dans la cognition nécessite l'observation et la manipulation de systèmes neuronaux intacts, et ne peut donc se faire que sur l'animal vivant. Il est en effet à ce stade de nos connaissances impossible de modéliser de façon réaliste le fonctionnement cognitif *in vitro* ou *in silico*. Nous avons opté pour l'utilisation du rat et de la souris car ces rongeurs présentent le meilleur équilibre entre les bénéfices (accessibilité expérimentale et pertinence par rapport aux pathologies chez l'homme) et les dommages escomptés (souffrance liées aux conditions d'élevage ou d'expérimentation).

Le nombre d'animaux nécessaires pour garantir un pouvoir statistique suffisant pour chacune de nos expériences est ici de 80 souris, répartis sur une période de projet de 5 années.

Les animaux utilisés sont des rats et des souris, dont certaines de lignées transgéniques qui expriment un marqueur moléculaire permettant de cibler spécifiquement les neurones du type d'intérêt, et de leur faire exprimer des molécules nous permettant de contrôler expérimentalement leur activité. Il devient ainsi possible de tester des hypothèses quant au rôle de ces neurones dans le circuit de façon causale (que se passe-t'il quand les réponses de ces neurones sont expérimentalement activées ou au contraire bloquées) et non plus seulement corrélative. Les marqueurs moléculaires spécifiques des lignées utilisées n'ont pas d'incidence sur la physiologie, en dehors des strictes périodes de manipulation de l'activité des neurones, et le phénotype des animaux est donc sans conséquence sur leur bien-être. Des éléments de distraction (les animaux sont élevés en cages collectives, autant que possible, selon des normes qui respectent leur besoin d'interactions sociales, et le milieu est enrichi avec du matériel de construction du nid) sont introduits dans les cages d'élevage pour pallier la monotonie des conditions d'élevage en laboratoire. Pour prévenir, détecter et corriger les conditions de mal-être éventuel, les animaux sont suivis de façon très régulière par du personnel spécialisé, formé et sensibilisé au bien-être animal.

Afin de minimiser la douleur, les interventions chirurgicales sont effectuées sous traitement anesthésique local, général et antalgique. La température corporelle est maintenue pendant toute la chirurgie et lors du réveil grâce à une couverture chauffante. Un gel protecteur évite l'assèchement de l'œil. A l'issue de l'opération, l'évolution de la cicatrisation est suivie et l'animal est surveillé quotidiennement pendant plusieurs jours. Les animaux sont ensuite habitués progressivement à la condition expérimentale (pas plus de quelques minutes par jour au départ), toujours associée à un renforcement positif (friandise pendant ou après la session). Pendant toute la période expérimentale, des points limites sont fixés pour minimiser la souffrance et l'angoisse. Si l'animal présente des signes visibles de mauvaise santé ou d'inconfort (immobilité de l'animal, état de détérioration de sa fourrure (absence de toilettage par exemple), absence de la réaction comportementale aux stimuli externes, agressivité anormale lors de la manipulation, tremblements, attitude voutée ou poils hérissés, perte de poids de 20% ou plus par rapport au poids avant expérience / chirurgie), la première mesure sera l'intervention du vétérinaire et l'isolement de l'animal. En l'absence d'amélioration de l'état de l'animal dans les 24h après le traitement éventuel décidé par le vétérinaire au vu des symptômes, l'animal est euthanasié pour éviter toute souffrance supplémentaire.

11114 Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération anarchique de cellules anormales. Les données actuelles montrent que les cellules cancéreuses ont la particularité unique de détourner d'autres cellules saines du corps à leur profit. Cette association est responsable de l'aggravation de la maladie et notamment favorise la formation des métastases. En médecine humaine, pour parer à ce processus, il est nécessaire de comprendre comment cette association fonctionne et d'identifier des acteurs clés. Nous avons identifié un gène potentiellement impliqué dans ce phénomène. Notre but est d'utiliser des souris transgéniques pour montrer son impact sur la progression tumorale et à terme en faire une cible thérapeutique. Il est impossible de remplacer la souris pour ces études, car la progression tumorale implique tout l'organisme. L'emploi de souris génétiquement modifiées avec un système immunitaire fonctionnel permet de réduire le nombre d'expériences et d'animaux et de faciliter la transposition des conclusions vers l'Homme. Seuls 220 animaux seront nécessaires à la conduction du protocole, les modèles ont été sélectionnés pour accroître la pénétrance de la maladie et éviter l'utilisation d'animaux non atteints. Trois protocoles d'induction des tumeurs sont employés car ils permettent d'appréhender les différentes étapes de la progression tumorale, qui sont la formation de la tumeur, la dissémination locale de l'organe et la dissémination à distance de la maladie dans l'organisme entier. Un examen régulier des animaux, la définition des points limites et le recours à une analgésie devraient limiter le phénotype dommageable dû à la présence de tumeurs.

11115 La toxoplasmose est une infection parasitaire causée par un protozoaire intracellulaire, *Toxoplasma gondii*. Dans la majorité des cas d'infection humaine, la toxoplasmose est une maladie asymptomatique. En effet, le système immunitaire permet un ralentissement de la vitesse de multiplication du parasite qui va former des kystes tissulaires dans différents types de tissus, tels que le cerveau ou le cœur. Cependant, chez les immunodéprimés, une réactivation du parasite peut être observée, menant à des formes plus graves : l'encéphalite et la rétinocoroïdite, due à des lésions au niveau de la rétine. De plus, chez la femme enceinte séronégative, une infection à *T. gondii* peut provoquer des malformations du fœtus au niveau de l'œil et du cerveau, voire un avortement. L'infection humaine se fait principalement par voie orale, soit par ingestion d'oocystes extrêmement résistants, rejetés par les chats et autres félinidés (hôtes définitifs, HD) dans l'environnement, souillant fruits, légumes ou eau de boisson ; soit par consommation de viande crue ou mal cuite contenant des kystes tissulaires présents dans les viandes d'animaux de bétail ou de gibier (hôtes intermédiaires, HI). La viande de porc est un vecteur potentiel, puisque 40,4kg de viande de porc sont consommés par ménage et par an, dont les $\frac{3}{4}$ sont dégustés sous la forme de produits de charcuterie-salaison. Pourtant la possibilité de transfert de *T. gondii* chez l'homme via la consommation de produits crus de salaison est incertaine. Ceci s'explique d'une part par une méconnaissance du tropisme musculaire du parasite chez le porc et d'autre part par une absence de données scientifiques robustes permettant d'évaluer l'effet inhibiteur des étapes de fabrication

et de conservation de ces produits. Ce projet de recherche se propose d'y répondre sur la base de deux axes d'étude consistant à (i) décrypter de manière approfondie l'organotropisme de *T. gondii* au sein de carcasses de porcs expérimentalement infestées (kyste versus oocyste) ; (ii) évaluer l'impact du procédé de fabrication (incluant différents taux d'incorporation en nitrites et en NaCl) et de la conservation du saucisson sec sur la viabilité de *T. gondii*.

Afin de pouvoir étudier cela, il est indispensable de travailler sur des organismes entiers vivants. Sur les 5 ans du projet, 7 porcs, 13 chats et 78 souris seront inclus dans les protocoles. Les expérimentations conduites seront faites dans le respect de la règle des « 3R » (ensemble de recommandations concernant les moyens à mettre en œuvre pour limiter l'utilisation des animaux : Remplacer, Réduire et Raffiner), en particulier, le nombre d'animaux utilisés sera le plus faible possible tout en permettant l'obtention de résultats interprétables. La sécurité sanitaire des produits de salaison à partir de viande de porc constitue donc un enjeu majeur pour la protection de la santé publique. Le plus grand soin sera pris pour minimiser l'impact des manipulations sur les animaux : les inoculations de parasites seront réalisées par voie orale (sauf chez la souris) dans des aliments très appétants pour l'espèce en question. L'infestation par toxoplasma est asymptomatique chez l'animal comme chez l'Homme (à l'exception du fœtus). Les animaux seront hébergés en groupes sociaux compatibles, ce qui pour les trois espèces est la méthode d'amélioration de leur condition de vue la plus efficace et des éléments d'enrichissement du milieu seront distribués.

11116 L'objectif du projet est de comprendre sur des modèles expérimentaux chez le rongeur (souris) les propriétés des réseaux neuronaux qui sous-tendent l'encodage, le traitement et le stockage des informations ainsi que les déficits cognitifs associés aux principales pathologies cérébrales (maladies neurodéveloppementales, neurodégénératives, épilepsie) aux conséquences dévastatrices. Les réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire, et qui sont affectés dans ces pathologies, impliquent des interactions entre différentes régions cérébrales, et entre des types distincts de neurones. Dans ce projet, nous allons utiliser des techniques de biologie moléculaire (opto- et pharmaco-génétique) permettant de manipuler l'activité de populations neuronales spécifiques afin de mieux comprendre comment ils contrôlent les circuits impliqués dans la mémoire.

Les avantages escomptés sont une meilleure compréhension du fonctionnement cérébral et de ses pathologies (neurodéveloppementales, neurodégénératives, épilepsie), ce qui représente un intérêt sociétal considérable.

Les dommages escomptés sont d'une façon générale l'élevage et le sacrifice prématuré de souris à des fins de recherche, c'est à dire dans des conditions artificielles et monotones par rapport à une vie sauvage ou domestique, et parfois en cage individuelle pendant la période expérimentale, entraînant un déficit de relations sociales chez ces espèces grégaires. Le projet implique également des interventions chirurgicales (craniotomie) afin d'injecter des constructions virales, avec l'inconfort associé au réveil post-chirurgical et un risque infectieux.

Ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement.

L'étude des propriétés des circuits neuronaux impliqués dans la cognition nécessite l'observation et la manipulation de systèmes neuronaux intacts, et ne peut donc se faire que sur l'animal vivant. Il est en effet à ce stade de nos connaissances impossible de modéliser de façon réaliste le fonctionnement cognitif *in vitro* ou *in silico*. Nous avons opté pour l'utilisation de la souris car elle présente le meilleur équilibre entre les bénéfices (accessibilité expérimentale et pertinence par rapport aux pathologies chez l'homme) et les dommages escomptés (souffrance liées aux conditions d'élevage ou d'expérimentation).

Le nombre d'animaux nécessaires pour garantir un pouvoir statistique suffisant pour chacune de nos expériences est ici de 182 souris, réparties sur une période de projet de 5 années.

Les animaux utilisés sont des souris transgéniques, qui expriment un marqueur moléculaire permettant de cibler spécifiquement les neurones du type d'intérêt, et de leur faire exprimer des molécules nous permettant de contrôler expérimentalement leur niveau d'activité. Il devient ainsi possible de tester des hypothèses quant au rôle de ces neurones dans le circuit de façon causale

(que se passe-t-il quand ces neurones sont expérimentalement activés ou au contraire bloqués) et non plus seulement corrélative (quand ces neurones sont-ils actifs). Les marqueurs moléculaires spécifiques des lignées utilisées n'ont pas d'incidence sur la physiologie, en dehors des strictes périodes de manipulation de l'activité des neurones, et le phénotype des animaux est donc sans conséquence sur leur bien-être. Des éléments de distraction (les animaux sont élevés en cages collectives, autant que possible, selon des normes qui respectent leur besoin d'interactions sociales, et le milieu est enrichi avec du matériel de construction du nid) sont introduits dans les cages d'élevage pour pallier la monotonie des conditions d'élevage en laboratoire. Pour prévenir, détecter et corriger les conditions de mal-être éventuel, les animaux sont suivis de façon très régulière par du personnel spécialisé, formé et sensibilisé au bien-être animal.

Afin de minimiser la douleur, les interventions chirurgicales sont effectuées sous traitement anesthésique local, général et antalgique. La température corporelle est maintenue pendant toute la chirurgie et lors du réveil grâce à une couverture chauffante. Un gel protecteur évite l'assèchement de l'œil. A l'issue de l'opération, l'évolution de la cicatrisation est suivie et l'animal est surveillé quotidiennement pendant plusieurs jours. Les animaux sont ensuite habitués progressivement à la condition expérimentale (pas plus de quelques minutes par jour au départ), toujours associée à un renforcement positif (friandise pendant ou après la session). Pendant toute la période expérimentale, des points limites sont fixés pour minimiser la souffrance et l'angoisse. Si l'animal présente des signes visibles de mauvaise santé ou d'inconfort (immobilité de l'animal, état de détérioration de sa fourrure (absence de toilettage par exemple), absence de la réaction comportementale aux stimuli externes, agressivité anormale lors de la manipulation, tremblements, attitude voutée ou poils hérissés, perte de poids de 20% ou plus par rapport au poids avant expérience / chirurgie), la première mesure sera l'intervention du vétérinaire et l'isolement de l'animal. En l'absence d'amélioration de l'état de l'animal dans les 24h après le traitement éventuel décidé par le vétérinaire au vu des symptômes, l'animal est euthanasié pour éviter toute souffrance supplémentaire.

11117 Nous souhaitons élucider les mécanismes neurobiologiques à l'échelle cellulaire et moléculaire impliqués dans la formation et la stabilisation des souvenirs chez le rongeur. Nous nous intéressons tout particulièrement à l'interface entre deux structures cérébrales, l'hippocampe et le cortex qui jouent un rôle clé dans la mise en place d'une mémoire à long terme. Ainsi des rats adultes sont soumis à un test cognitif permettant d'appréhender les différents processus de la mémorisation (encodage, consolidation et rappel des souvenirs). Des études, réalisées dans notre laboratoire, ont d'ores et déjà indiquées que le stockage de nos souvenirs au niveau du cortex s'accompagnait d'un remodelage de l'architecture du neurone. L'objectif scientifique de notre projet est d'élucider les caractéristiques moléculaires des neurones qui stockeront dans le cortex la future mémoire. Puis de déterminer si les changements structuraux de ces neurones sont nécessaires au stockage de la mémoire à long terme. Enfin parce que des accumulations corticales de la protéine β Amyloïde sont observées très précocement dans la maladie d'Alzheimer, nous déterminerons si des accumulations de β Amyloïde au niveau du cortex peuvent mimer l'oubli accéléré observé dans la maladie d'Alzheimer et les mécanismes moléculaires à l'origine de ces effets. Dans les études sur la mémoire, il n'est pas possible de remplacer le modèle animal par des méthodes de substitution. Ces travaux vont être réalisés par une approche comportementale utilisant la transmission sociale de préférence alimentaire pour tester les performances mnésiques. Basé sur l'observation éthologique du comportement social du rat et non-aversif, ce test induit peu ou pas de stress pour l'animal. Le bien-être des animaux, engagés dans un test comportemental est d'autant plus crucial qu'il peut influencer les conclusions de notre étude ; leur suivi est donc quotidien, de leur arrivée à la fin de l'expérience et leur bien-être indispensable. De plus l'utilisation d'un test unique nous permet de pouvoir comparer nos résultats à ceux déjà obtenus et de réduire le nombre de groupe d'animaux en réduisant des groupes contrôles d'ores et déjà réalisés. Le raffinement des protocoles qui consiste à agir directement sur la cible choisie par l'injection intracérébrale, permet également de réduire le nombre d'animaux. Pris dans leur ensemble, nos travaux pourraient montrer que l'implication d'un neurone dans le stockage n'est pas aléatoire et que les changements structuraux lors de l'apprentissage jouent un rôle majeur dans le stockage. Une altération de ce processus

pourrait expliquer l'oubli anormalement rapide observé dans la maladie d'Alzheimer. A terme les outils testés pourraient permettre d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans les pathologies touchant la mémoire et en particulier dans la maladie d'Alzheimer. Ce projet va nécessiter 750 animaux dont l'utilisation sera répartie sur trois ans.

11118 Au cours de la dernière décennie une meilleure connaissance de la physiopathologie du sepsis a permis de mettre en exergue le rôle fondamental que jouait l'endothélium. Ce dernier participe activement à la défense de l'organisme contre les agents pathogènes en recrutant les leucocytes vers les sites infectés, en libérant des médiateurs inflammatoires et en favorisant localement la coagulation, évitant ainsi la diffusion hématogène de l'infection. Cependant, lors du sepsis, de nombreuses études ont mis l'accent sur une atteinte de la cellule endothéliale qualifiée de dysfonction endothéliale. Lors du sepsis, cette dysfonction se manifeste par d'importantes modifications phénotypiques qui jouent un rôle important dans la genèse de la défaillance multi-viscérale.

Parmi les biomarqueurs clés de cette atteinte endothéliale, on retrouve l'Angiopoiétine-2 (Ang-2). Il a déjà été montré qu'à l'état physiologique Ang-2 est produite généralement par les cellules endothéliales elles-mêmes, stockée dans les organes de Weibel-Palade et n'affecte pas l'état de l'endothélium. En revanche, dans des situations pathologiques, l'inflammation stimule l'exocytose des corps de Weibel-Palade, Ang-2 est ainsi libérée et se lie préférentiellement à son récepteur (Tie-2). De nombreuses études montrées qu'Ang-2 est non seulement un biomarqueur diagnostic et pronostic dans le choc septique mais joue aussi un rôle important dans l'amplitude de l'inflammation, la perméabilité vasculaire, l'altération de l'architecture de l'endothélium, la régulation du tonus vasculaire et est associé fortement à la défaillance multi-viscérale ainsi que la mortalité.

L'étude décrite dans le présent projet sera réalisée dans le cadre d'une collaboration afin de développer deux inhibiteurs spécifiques d'Ang-2. Le principal objectif de l'étude est d'évaluer les effets de ces deux inhibiteurs au cours du choc septique expérimental. Deux modèles expérimentaux seront utilisés à savoir le modèle Lipopolysaccharide (LPS) par injection intrapéritonéale et un modèle de péritonite par ligation et perforation caecale (CLP). D'une part, le modèle LPS est facile à mettre en place et conduit au développement de différents symptômes comparables à ceux retrouvés chez les patients septiques, d'autre part, le modèle CLP constitue le gold standard par sa pertinence clinique le rapprochant du choc septique humain. De plus, c'est un modèle bien maîtrisé par notre équipe et nécessitant peu de manipulation.

Dans un premier temps, plusieurs doses de deux inhibiteurs de l'Ang-2 seront testées afin d'évaluer leurs efficacités. La survie sera le premier test à réaliser afin de sélectionner la dose efficace. Cette dose sera utilisée pour étudier d'autres paramètres tels que : la dysfonction endothéliales (la réactivité vasculaire, l'atteinte microcirculatoire), les profils leucocytaires, la dysfonction d'organes, les marqueurs inflammatoires et endothéliaux, le taux d'Ang-2 dans des différents compartiments.

Dans un second temps, nous souhaiterons évaluer l'efficacité d'un co-traitement à savoir une dose efficace de chaque inhibiteur d'ang-2 avec l'inhibiteur de TREM-1 afin de cibler à la fois la réponse inflammatoire générée par les leucocytes et aussi celle de l'endothélium. Après une deuxième étude de survie, une seule dose sera retenue pour chaque inhibiteur afin d'étudier plusieurs paramètres notamment la dysfonction endothéliales (atteinte microcirculatoire, la réactivité vasculaire), les marqueurs inflammatoires et endothéliaux, les profils leucocytaires, la dysfonction d'organes.

Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

Remplacement : Il n'existe aucune approche *in vitro* qui pourrait nous permettre d'étudier le rôle d'Ang-2 dans le développement du choc septique. Une étude chez un organisme vivant est indispensable pour mettre en évidence l'effet de l'inhibition de l'Ang-2 sur l'ensemble des paramètres contribuant au développement du sepsis et évaluer réellement le potentiel thérapeutique des différents traitements. Réduction : l'étude sera réalisée avec un nombre total de 1163 souris afin de constituer les différents groupes d'analyses. Chaque groupe comportera un

nombre d'animaux qui dépend de la procédure à réaliser : un nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, au vu des analyses qui seront conduites à partir de ces animaux. Nous avons veillé à réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaire tout en garantissant une puissance statistique suffisante. Raffinement : Dès leur réception, les animaux auront une période d'acclimatation d'une semaine pour s'adapter à leur nouvel environnement. Ils seront hébergés dans une animalerie dotée de tous les paramètres nécessaires (température, hygrométrie, filtration de l'air, ...) à leur bien-être. Les animaux seront hébergés en portoir avec des cages ventilées et filtrées, à 5 souris par cage, dans des cages de 500 cm². Les cages seront enrichies à la base de tunnel de polycarbonate et/ou buchettes en peuplier. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. Pour le bien-être des souris, celles-ci resteront en groupe dans un milieu enrichi et seront régulièrement surveillées. Si un animal montre des signes de mal être, les dispositions adéquates à la situation seront prises comme la prise d'analgésique en cas de douleur. Nous mettons également l'accent sur les méthodes utilisées (injection intrapéritonéale de LPS, anesthésie générale, pose du cathéter, soins post-opératoires, etc.) permet ainsi un raffinement de la méthodologie. Par ailleurs, une procédure d'estimation (un score sera attribué pour chaque paramètre) et suppression de la souffrance sera mise en place. Le point limite sera fixé à 20% de perte du poids corporel avec identification des signes de mal-être définis au préalable. En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des prélèvements sanguins et d'organes seront effectués pour permettre de réaliser nos analyses.

11119 Le problème actuel en transplantation est que les immunosuppresseurs, seuls traitements efficaces pour éviter le rejet de greffe, ont de larges effets secondaires tels que les cancers et infections. Une alternative à cette immunosuppression totale est de promouvoir les Tregs spécifiques du greffon *in vivo* pour maîtriser le rejet de greffe.

Nous avons fait la preuve de concept chez le rat, dans un modèle de transplantation cardiaque incompatible pour le CMH II, que l'administration continue d'une faible dose d'un peptide dérivé du CMH II du donneur chez le receveur amplifiait le nombre et la fonction de lymphocytes T régulateurs alors capables de maîtriser le rejet de greffe.

Nous avons identifié *in vitro* un peptide dérivé d'une molécule de CMH II humain permettant d'augmenter la fonction et d'amplifier le nombre de lymphocytes T régulateurs humains *in vitro*.

L'objectif de ce protocole est de valider les propriétés thérapeutiques de ce peptide humain dans un modèle de transplantation *in vivo*. Nous avons montré le potentiel thérapeutique des cellules humaines Tregs CD8⁺ (par injection de Tregs amplifiées *in vitro* selon le principe de thérapie cellulaire) en transplantation dans un modèle de réaction du greffon contre l'hôte (GVH) chez la souris NSG.

Le peptide identifié ne peut être présenté que par le CMH I type HLA-A2 aux Tregs CD8. Des souris NSG ont été génétiquement modifiées pour exprimer la molécule HLA-A2 humaine, ce modèle est le seul permettant une présentation de ce peptide.

Nous planterons dans l'abdomen de souris NSG transgéniques pour HLA-A2 une mini pompe osmotique capable de délivrer une dose continue de peptide du donneur comme réalisé précédemment dans le modèle de rat (la pompe ici utilisée étant adaptée aux souris de plus petite taille). Nous injecterons ensuite des PBMCs humains en i.v. (d'un individu n'exprimant pas le peptide du donneur, source d'histo-incompatibilité, représentant le « receveur » de greffe) pour induire une réaction xénogénique contre la souris. Cette réaction se caractérise par une perte progressive de 20% (point limite) du poids de la souris en environ 14 jours. La présentation du peptide du donneur par le HLA-A2 exprimé par les cellules de souris aux Tregs CD8 humaines (du « receveur ») devrait amplifier le potentiel suppresseur des Tregs CD8 et inhiber la réaction xénogénique.

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit :

- Remplacer : La preuve de concept a été faite dans un modèle de rat, mais les molécules de CMH sont très différentes entre les espèces. Des études fonctionnelles ont été réalisées *in vitro* avec des

cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études *in vivo*. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité thérapeutique du peptide humain identifié dans un modèle *vivo* dit « humanisé ».

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 10, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (Log Rank test pour les courbes de survie, description des tests statistiques utilisés détaillée ci-après). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total maximum d'animaux est de 70.

-Raffiner : Les souris seront anesthésiées durant le placement intra abdominal d'une mini pompe osmotique par injection d'un mélange de kétamine 80mg/kg +xylazine 10mg/kg en ip. Elles recevront avant l'opération et le lendemain de l'opération les analgésiques meloxicam 0.3 mg/kg s.c + 50 µg/kg Buprénorphine i.m. Les souris seront placées sur tapis chauffant jusqu' à leur réveil après l'opération. Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement seront euthanasiés par inhalation d'isoflurane en surdose (5%/l d'air) puis dislocation cervicale.

Des prélèvements sanguins seront effectués tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG. Tous les animaux traités avec les cellules régulatrices et ceux des groupes contrôles seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de GVH, et par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique du peptide sur les réponses immunes intervenant dans des contextes d'allogreffe de moelle osseuse, aideront à déterminer la dose de peptide à administrer chez un patient pour le traiter, et permettront de mieux comprendre l'impact de ce peptide sur la prolifération, la fonction et la migration des Tregs par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées. Il n'existe actuellement pas de traitement efficace pour contrôler la GVHD chez les patients transplantés moelle osseuse. Cette étude est appuyée par un brevet quant à l'utilisation d'un peptide dérivé du donneur en tant que traitement dans le domaine de la transplantation d'organe solide et de cellules. La validation de ce peptide dans ce modèle préclinique de souris humanisée est une étape indispensable avant les tests cliniques.

11120 Le choc septique est un syndrome représentant le stade ultime de progression des infections sévères et résulte d'une réponse de l'hôte disproportionnée et dysrégulée. C'est une cause majeure de mortalité dans les unités de soins intensifs et un problème clinique crucial de ces dernières années. La prise en charge des patients ayant été grandement améliorée au cours des dernières années, la mortalité précoce des patients septiques a significativement baissé, laissant place à une majorité de morts tardives liées à des dysfonctions de certains organes et une immunosuppression menant au développement de maladies secondaires ou nosocomiales. En effet, la mise en jeu du système immunitaire inné, fondamental dans la lutte anti-infectieuse, peut s'avérer excessive, avec notamment à la phase initiale, une synthèse accrue de médiateurs pro-inflammatoires, la génération d'un état pro-coagulant, le tout participant de la défaillance d'organes à distance du site primitif d'infection. Malgré une physiopathologie de mieux en mieux connue, aucun traitement spécifique n'a à ce jour fait la preuve définitive de son efficacité : la prise en charge demeure largement symptomatique, ce qui explique la persistance d'une mortalité associée à ce syndrome. Plusieurs travaux précliniques concernant l'utilisation d'un immunomodulateur (inhibiteur pharmacologique de TREM-1) au cours du sepsis ont clairement montré une amélioration de la survie, une diminution de la défaillance d'organes, une diminution de la bactériémie et une modulation de la réponse inflammatoire. Dans notre étude, un modèle murin simple d'inflammation aiguë consiste en l'injection de lipopolysaccharide (LPS) par voie intrapéritonéale. Ce modèle possède l'avantage de contrôler de manière fine la quantité de matériel bactérien qui est injecté. Il est simple d'utilisation

et très reproductible, ce qui le rend particulièrement attractif et largement utilisé. L'injection de LPS par voie intrapéritonéale conduit au développement de différents symptômes comparables à ceux retrouvés chez les patients septiques. Le LPS induit l'activation systémique de l'immunité innée et une libération de cytokines pro-inflammatoires, une hypotension artérielle systémique, ou encore des dysfonctions dans la contractilité du muscle cardiaque. Dans cette étude, différentes doses de cet immunomodulateur seront administrées dans un modèle simple et reproductible de choc septique murin induit par injection intrapéritonéale de LPS. Différentes approches seront utilisées pour mesurer l'efficacité du peptide en fonction de la dose administrée à savoir la survie, le profil d'expression de TREM-1 (génique et protéique), les profils leucocytaires dans les différents compartiments à savoir le sang, la rate, la moelle osseuse, et les marqueurs inflammatoires et endothéliaux. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». Remplacement : Il n'existe aucune approche *in vitro* qui pourrait nous permettre d'étudier le rôle de TREM-1 dans le développement du choc septique. Une étude chez un organisme vivant est indispensable pour mettre en évidence l'effet de l'inhibition de TREM-1 sur l'ensemble des paramètres contribuant au développement du sepsis et évaluer réellement le potentiel thérapeutique du traitement. Réduction : l'étude sera réalisée avec un nombre total de 745 animaux afin de constituer les différents groupes d'analyses. Chaque groupe comportera un nombre d'animaux qui dépend de la procédure à réaliser : un nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, au vu des analyses qui seront conduites à partir de ces animaux. Nous avons veillé à réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaire tout en garantissant une puissance statistique suffisante. Raffinement : Dès leur réception, les animaux auront une période d'acclimatation d'une semaine pour s'adapter à leur nouvel environnement. Ils seront hébergés dans une animalerie dotée de tous les paramètres nécessaires (température, hygrométrie, filtration de l'air, ...) à leur bien-être. Les animaux seront hébergés en portoir avec des cages ventilées et filtrées, à 5 souris par cage, dans des cages de 500 cm². Les cages seront enrichies à la base de tunnel de polycarbonate et/ou buchettes en peuplier. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. Pour le bien-être des souris, celles-ci resteront en groupe dans un milieu enrichi et seront régulièrement surveillées. Si un animal montre des signes de mal être, les dispositions adéquates à la situation seront prises comme la prise d'analgésique en cas de douleur. Nous mettons également l'accent sur les méthodes utilisées (injection intrapéritonéale de LPS, anesthésie générale, pose du cathéter, soins post-opératoires, etc.) permet ainsi un raffinement de la méthodologie. Par ailleurs, une procédure d'estimation (un score sera attribué pour chaque paramètre) et suppression de la souffrance sera mise en place. Le point limite sera fixé à 20% de perte du poids corporel avec identification des signes de mal-être définis au préalable. En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des prélèvements sanguins et d'organes seront effectués pour permettre de réaliser nos analyses

11121 L'objectif de ce projet est de produire différentes fournitures biologiques tels que du sang, du sérum, du plasma, du lait, du colostrum, de l'urine, des fèces ou de la salive de chien qui sont nécessaires à la recherche et au développement, ainsi qu'au diagnostic en santé humaine et vétérinaire. Il inclut tous types de prélèvements qui n'engendrent pas de souffrance à long terme et ne requiert pas une procédure terminale.

Seuls les animaux en bonne santé sont sélectionnés. Leur nombre, sexe et âge sont fonction des critères précisés par le client. Ils peuvent être utilisés plusieurs fois tant que cela n'impacte pas leur bien-être.

Les méthodes employées pour les différents prélèvements visent à limiter au maximum la douleur, la souffrance et l'anxiété des animaux et sont réalisées par un personnel compétent.

Les animaux sont hébergés sur le site du fournisseur, dans des conditions qui tiennent compte de leur bien-être.

Sur 5 ans le nombre d'animaux utilisé est estimé à 800. A l'issue de la procédure expérimentale, tous ces animaux sont mobilisables pour d'autres projets.

L'utilisation de chiens sur ce projet est justifiée car ces prélèvements peuvent permettre par la suite de réaliser des projets *in vitro* et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés en recherche.

11122 Le but de cette étude est d'évaluer l'impact d'un traitement sur la récupération fonctionnelle chez le rat juvénile. L'accident vasculaire cérébral (AVC) provoque une hypoexcitabilité dans le cortex moteur du péri-infarctus en raison d'une activité accrue de GABAergique sur les neurones. Alors que cette inhibition chroniquement élevée dans la région du péri-infarctus peut avoir un effet neuroprotecteur sur l'AVC, elle peut antagoniser la récupération fonctionnelle par la suite. Certains travaux ont montré que le modulateur allostérique négatif GABA_A $\alpha 5$ (NAM) était capable de réduire cette inhibition tonique excessive et d'inverser les déficits moteurs induits par les AVC chez les rongeurs. L'effet de cette « molécule X » a déjà été évalué sur la récupération fonctionnelle post-AVC chez plusieurs modèles de rongeurs adultes. Les résultats ont montré que cette « molécule X » à une concentration 10-15 mg/kg réduisait le déficit sensorimoteur induit par l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM) permanente lorsque le traitement est administré de manière chronique en administration orale à partir de 3 jours post-AVC, et que cet effet bénéfique était maintenu après 14 jours. Ce traitement a également amélioré la cognition chez les souris et les rats soumis à une occlusion transitoire de l'ACM. Sur la base de cette justification scientifique, la « molécule X » est actuellement évaluée sur la récupération fonctionnelle chez des patients adultes post-AVC dans un essai clinique de phase IIb.

Dans la population pédiatrique, l'AVC touche 500 à 1000 enfants chaque année en France, ce qui justifie le fait de devoir établir une nouvelle stratégie thérapeutique. La raison d'améliorer l'effet de récupération fonctionnelle post-AVC potentiellement fourni par ce traitement s'applique aux enfants ayant atteint une maturation et une stabilité acceptables du système GABAergique (plus de 6 ans). Ce traitement devrait améliorer la récupération post-AVC. Afin de soutenir le développement de la « molécule X » dans la population pédiatrique humaine, l'effet de ce traitement sera d'abord évalué sur la récupération fonctionnelle dans un modèle d'AVC chez le rat juvénile (n=137 rats Sprague-Dawley mâles de 28 jours). L'âge des animaux sera le même que dans les études toxicologiques réalisées en amont sur les juvéniles.

Etant donné qu'aucune étude n'est actuellement disponible dans la littérature sur les rats de 28 jours, la première étape de ce projet correspondra à une validation technique d'un modèle d'ischémie-reperfusion. En effet, la taille du filament et la durée nécessaire pour induire des déficits reproductibles sont inconnus, de même que les volumes de lésions et mortalité. Après avoir validé ce modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat de 28 jours, l'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de l'administration chronique de 3 doses de ce traitement sur la récupération sensorimotrice et cognitive liés à ce modèle.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner). Notre projet correspond à l'étape de validation *in vivo* d'une stratégie thérapeutique, qui fait suite aux validations réalisées *in vitro*. Aucun modèle informatique permettant de modéliser de tels mécanismes n'est à ce jour disponible. Ainsi, l'étude de la récupération fonctionnelle post-AVC ne peut se faire que sur un organisme entier et vivant, et ne nous permet donc pas d'utiliser d'autres moyens que de tester chez l'animal. Dans un but de raffinement, toutes les procédures seront organisées afin de réduire l'inconfort et le stress liés à la manipulation de l'animal. Toutes les procédures douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale associée à une couverture analgésique pour limiter au maximum les sensations de douleur. De plus, l'association d'une étude de puissance statistique basée sur la littérature de ce modèle chez l'animal adulte permettra de réduire drastiquement le nombre d'animaux utilisés (n=137).

Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Les animaux sont hébergés dans des cages

standards aux normes européennes suite à la chirurgie. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

11123 La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin qui affecte 120000 personnes en France. Des souches de *Escherichia coli* Adhérents et Invasifs (AIEC) ont été retrouvées au niveau de l'iléon chez 36,4% des patients atteints de maladie de Crohn et chez seulement 6% des contrôles. Les bactéries AIEC sont capables d'adhérer à la muqueuse iléale via le récepteur CEACAM6 anormalement exprimé chez les patients. La colonisation du tube digestif par les bactéries AIEC est étudiée *in vivo* grâce à un modèle de souris exprimant le récepteur aux bactéries, la glycoprotéine CEACAM6. Il a été observé que, dans ce modèle d'infection, les levures pouvaient diminuer la colonisation du tube digestif par les bactéries AIEC ainsi que l'inflammation intestinale qui en résulte.

Différentes parties de la levure seront analysées dans ce modèle de souris infectées par les bactéries AIEC afin de rechercher quelle fraction de la levure est essentielle à son effet bénéfique. Différentes fractions de levures seront purifiées puis testées *in vitro* pour leur capacité à inhiber l'adhésion des bactéries AIEC à des cellules épithéliales intestinales en culture. Les 3 produits de levures présentant les meilleurs pouvoirs inhibiteurs d'adhésion lors de la phase de criblage *in vitro* seront testés *in vivo* en modèle murin infectées par les bactéries AIEC. Il est nécessaire de tester ces produits de levures en modèle animal car il n'existe pas de méthode alternative permettant de prendre en compte l'influence de l'environnement du tractus digestif et d'étudier la réponse de l'hôte. Les fractions seront analysées pour leur capacité à diminuer la charge en bactéries AIEC dans le tube digestif, la sévérité de la diarrhée et l'inflammation intestinale. Cet effet sera comparé à celui d'un traitement avec la levure entière. Il s'agit d'analyser si les produits issus de la levure conservent leurs propriétés antiadhésives observées *in vitro*, suite à leur administration orale et d'analyser si la diminution de la colonisation est accompagnée d'une réduction de la colite. Dans une seconde partie, le projet vise à tester le produit de levure ayant obtenu le meilleur résultat *in vivo* à 3 doses différentes afin d'analyser l'effet-dose et de déterminer la dose minimale pour conserver les effets bénéfiques. Pour la réalisation de ces travaux, 280 souris seront nécessaires.

Le protocole se situe en classe légère concernant la sévérité de l'expérience. Les animaux seront disposés dans des cages de 450 cm². Une période d'acclimatation sera réalisée avant le début de la procédure (une semaine). Un enrichissement est proposé aux souris : lamelles de cartons compressés et maisonnettes. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé pendant toute la durée de l'expérience.

Afin de respecter la règle des 3R « Réduire, Raffiner, Remplacer » tout au long de ces expérimentations, des points limites précis (présence de sang dans les fèces pendant plus d'une semaine, diminution de la motricité spontanée, posture voûtée, poils piqués) sont proposés de façon à réduire la souffrance des animaux les plus atteints. La perte de poids supérieure à 20% est un critère d'interruption du protocole pour l'animal qui sera immédiatement euthanasié par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane.

La finalité de ce projet est de mettre au point une prophylaxie et/ou une thérapie antiadhésive alternative aux traitements antibiotiques actuels, ciblant les *Escherichia coli* associés à la maladie de Crohn, afin de diminuer l'inflammation chronique intestinale chez les patients atteints de cette maladie et colonisés par ces bactéries. L'identification de la fraction de la levure à la base de l'effet bénéfique permet d'envisager des traitements avec des produits purifiés et donc avec une activité maximale, et sans risque pour les patients car ne nécessitant pas d'administrer des produits vivants, contrairement aux stratégies probiotiques actuelles.

11124 La maladie de Pompe est une maladie rare très grave qui affecte 1 personne sur 40000 et entraîne une faiblesse musculaire et un déficit respiratoire, parfois associés à des problèmes cardiaques. Dans les cas les plus sévères, la maladie réduit considérablement l'espérance de vie des patients. Les possibilités de traitements actuels sont inefficaces et très coûteuses. Les mitochondries sont des composants cellulaires jouant un rôle primordial dans la respiration cellulaire et dans la production d'énergie dans la cellule : leur activité est fréquemment réduite dans la maladie de

Pompe. Afin d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques, notre projet a pour but de stimuler la fonction mitochondriale en apportant dans la cellule des molécules qui vont cibler et réduire le défaut mitochondrial.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour faire ces preuves de concept thérapeutiques, car les modèles cellulaires de la maladie ne permettent pas d'étudier les défauts liés à la fonction du muscle (perte de force non mesurable sur des modèles cellulaires, pas de remplacement possible). A l'opposé, les modèles murins de la maladie de Pompe reproduisent avec fidélité l'ensemble des aspects cellulaires et les symptômes de la maladie (faiblesse musculaire, réduction de l'espérance de vie).

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous avons sélectionné très drastiquement cinq molécules utilisées sur des critères d'efficacité : elles ont toutes montré des effets thérapeutiques dans des modèles animaux ayant un défaut de fonction mitochondriale. De plus, ces cinq molécules seront testées dans les animaux femelles du modèle murin de la maladie de Pompe : ces souris sont générées dans nos autres projets relatifs à cette maladie, mais ne sont pas utilisées dans les procédures expérimentales car leur phénotype est plus progressif que celui des mâles : nous utiliserons ces animaux pour sélectionner la molécule la plus efficace.

A l'âge de leur utilisation, les animaux n'auront pas de signes pathologiques et seront en tout point similaires à des animaux normaux : leur raffinement sera donc identique à ceux d'animaux normaux (carrés de coton, bricks, dômes dans les cages, surveillance trois fois par semaine, soins cutanés, oculaires ou autres si blessures occasionnelles).

Les molécules thérapeutiques apportées ne devraient pas entraîner une réponse immunitaire et seront véhiculées dans un tampon salin neutre : elles ne devraient donc pas créer de dommages supplémentaires aux souris modèles. Un important bénéfice thérapeutique est au contraire attendu, comme le suggèrent des études précédemment réalisées sur d'autres modèles de maladies neuromusculaires.

Le nombre de souris nécessaire a été estimé à 8 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes). Les souris seront élevées et reproduites dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 1 an et nécessitera l'utilisation totale de 56 souris.

11125 Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) de l'enfant et de l'adolescent sont des cancers pédiatriques rares, dont le pronostic s'est peu amélioré au cours des 25 dernières années. Les taux de rechute et de survie sont respectivement d'environ 45% et 65%. Le traitement standard comprend une poly-chimiothérapie, parfois associée à une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) pour les patients de haut risque ou en rechute. La greffe de CSH est un traitement lourd, source de séquelles à long terme. Des progrès sont donc nécessaires pour réduire le taux de rechute, améliorer la survie et limiter les séquelles. L'objectif de nos études est de caractériser les mécanismes mis en jeu dans les leucémies (cancer des cellules sanguines) de l'enfant à mauvais pronostic. Pour cela, nous identifions les gènes altérés par des mutations dans les échantillons de patients atteints de leucémie puis nous réalisons des approches fonctionnelles pour définir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Pour tester l'efficacité de nouvelles approches thérapeutiques, il est essentiel de pouvoir travailler sur les cellules tumorales les plus proches possibles de celles présentes chez les patients afin de prendre en compte la complexité génétique des tumeurs. Pour cela, les cellules de patients peuvent être cultivées *in vitro* pour obtenir des lignées cellulaires permanentes ou greffées dans des modèles murins immuno-compromis/déficients. Bien qu'utilisable pour obtenir de grandes quantités de cellules pour des analyses fonctionnelles, plusieurs études suggèrent que le comportement des lignes permanentes cultivées *in vitro* a considérablement divergé des tumeurs d'origine. Comme pour les tumeurs adultes, des études récentes sur les tumeurs malignes de l'enfant ont démontré l'apparition d'altérations génétiques sous-clonales dans les cellules leucémiques chez les patients au moment du diagnostic qui peuvent se développer de manière clonale au moment de la rechute. Les profils génomiques des cellules cultivées *in vitro* sont moins complexes que l'échantillon leucémique original, ce qui suggère que l'hétérogénéité est, en partie, perdue une fois qu'une

tumeur a été retirée d'un patient et cultivée *in vitro*. Cette observation peut, en partie, expliquer que les études fonctionnelles obtenues à partir de lignées cellulaires ont eu un pouvoir prédictif variable de la réponse chez les patients.

La xénogreffe dérivée du patient (PDX) développée après transplantation de la tumeur primaire humaine directement dans divers modèles murins immunodéprimés a été utilisée largement pour amplifier les cellules de plusieurs types de cancer. Les PDX conservent généralement les caractéristiques histologiques des tumeurs parentales et reflète mieux l'hétérogénéité de l'échantillon du patient. En outre, les modèles PDX peuvent ressembler étroitement aux échantillons de rechute imitant la sélection clonale observée à partir des échantillons de diagnostic en vrac à la rechute. Les modèles PDX sont donc des outils indispensables pour reproduire et étudier la biologie de tumeurs rares et pour lesquelles la quantité de matériel issu du patient est limitante (particulièrement pour les pathologies pédiatriques). Ils constituent également une plate-forme pour évaluer les médicaments anticancéreux dans des conditions physiologiques.

Dans ce projet nous utiliserons donc des souris immunodéficientes pour amplifier les cellules de patients leucémiques présentant des pathologies agressives et nous testerons de nouvelles approches thérapeutiques uniquement après les avoir validées dans des approches de traitement de cellules humaines *in vitro*. En utilisant des outils statistiques permettant de définir le nombre minimal d'animaux à utiliser pour obtenir des conclusions significatives pour chaque approche, nous prévoyons d'utiliser 1484 souris dans ce projet.

Il est important de noter que le projet définit des points limites précis (basés sur l'expertise obtenue avec d'autres modèles existants) et vise à réduire les contraintes et le nombre d'animaux utilisés dans ces procédures. Pour cela, deux approches seront suivies :

1-Réduire l'invasivité des prélèvements. Pour cela, nous introduisons des rapporteurs luminescents dans les cellules humaines afin de pouvoir suivre la prise de greffe et l'efficacité des traitements par des approches d'imagerie corps-entier sans prélèvements permettant une meilleure quantification de l'efficacité globale du traitement.

2-Réduire le nombre d'animaux utilisés. De nouvelles lignées de souris immunodéficientes sont développées régulièrement par d'autres laboratoires et certaines sont rapportées comme ayant un taux de greffe des cellules hématopoïétiques humaines supérieur et donc permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés pour ces approches. Nous comparerons l'efficacité de ces modèles à celui du modèle de référence pour la prise de greffe de nos échantillons leucémiques afin de sélectionner le modèle qui permettra de réduire le nombre de souris utilisées pour les greffes primaires.

Finalement, le projet a également pour objectif de d'identifier des approches alternatives à l'utilisation de modèles animaux pour l'étude des leucémies pédiatriques. Pour cela, nous utiliserons des modèles de cellules pluripotentes induites (IPSC) humaines cultivées *in vitro* et dans lesquelles nous exprimerons les oncogènes retrouvés dans les leucémies humaines. La différenciation des IPSC permettra d'obtenir des cellules hématopoïétiques exprimant ces oncogènes. Pour définir si ces modèles pourraient remplacer les analyses *in vivo*, une étape intermédiaire indispensable est de définir si les caractéristiques de cellules cultivées *in vitro* sont semblables à celles des cellules greffées dans des modèles murins immunodéficients *in vivo*. Ce projet a pour objectif de définir les propriétés tumorales des cellules exprimant les oncogènes des leucémies issues des IPSC. Le projet pourrait donc permettre, à terme, de réduire l'utilisation d'animaux pour réaliser certaines approches exclusivement *in vitro*.

11126 Notre projet concerne l'étude d'un parasite gastro-intestinal nommé *Cryptosporidium* sp. qui infecte un grand nombre de vertébrés y compris l'homme. Une difficulté majeure de l'étude de l'infection par *Cryptosporidium* est le fait que la culture *in vitro* soit difficile et ne puisse pas toujours être pratiquée en continu dans un système non axénique. En conséquence, l'accès aux étapes endogènes du cycle biologique du parasite est limité, la production de parasite en grande quantité n'est pas possible et enfin l'étude des modifications physiopathologiques induites par le parasite est

impossible. La seule manière pour le moment de remédier à toutes ces limitations est l'utilisation d'un modèle animal.

Le modèle expérimental de souris immunodéprimées infectées par *Cryptosporidium* sp. offre la possibilité (i) d'obtenir une quantité importante de parasites (ii) de caractériser phénotypiquement des isolats de *Cryptosporidium* sp. (iii) d'étudier la physiopathologie de la cryptosporidiose, et plus particulièrement le développement des lésions néoplasiques (iv) d'étudier le rôle du microbiote intestinal dans le développement de l'infection et dans l'induction de néoplasies (v) d'étudier l'effet des probiotiques sur l'infection à *Cryptosporidium* sp. et sur le développement des néoplasies qu'il induit (vi) d'étudier le rôle éventuel de la nutrition dans le développement des néoplasies induites par *Cryptosporidium* sp. En somme, ce projet étoffera nos connaissances sur le parasite, son mode d'action sur la cellule hôte et les modalités de contrôle de l'infection. Ce qui aura pour finalité de pouvoir extrapoler ces données à l'homme et ainsi d'éventuellement réduire le risque de développement de cancers coliques chez l'homme en éradiquant l'infection par *Cryptosporidium* sp.

Pour ce faire, nous aurons besoin de souris génétiquement (notamment des SCID (Cb17) et/ou chimiquement (traitement à la Dexaméthasone) immunodéprimées. Pour chaque expérimentation nous avons besoin d'au moins deux groupes de souris. Un groupe contrôle négatif (sans infection) et un groupe de souris infectées par *Cryptosporidium* sp. Cependant, le nombre de groupes de souris à utiliser dépendra des paramètres étudiés mais nous tâchons de réduire au minimum le nombre de groupes et le nombre de souris par groupe. Nous estimons que pour notre projet qui comprend trois procédures, nous utiliserons probablement 832 souris sur quatre ans. Ces souris encourent le risque de développer une cryptosporidiose et des lésions cancéreuses digestives.

Pour réduire la douleur, la souffrance ou l'angoisse le cas échéant, les animaux sont surveillés tous les trois jours jusqu'à J60 Post Infection (PI) et tous les jours ensuite. La souris présentant un comportement clinique anormal ou inquiétant (immobilité ou mobilité réduite, hyperventilation, perte de poids supérieur à 15%) sera mise à mort. Les animaux seront mis à mort par une technique recommandée par la directive européenne 2010UE (inhalation de CO₂). Egalement, afin de répondre aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement nous sommes en train de développer au sein de notre équipe une méthode de culture *ex vivo* d'intestins de souris que l'on infectera par *Cryptosporidium* sp. et qui pourra, certes de façon plus limitée qu'avec le modèle animal, nous apporter un certain nombre de connaissances sur les dommages cellulaires que le parasite peut induire sur l'intestin d'un mammifère. Cela réduira l'utilisation du modèle animal mais ne le remplacera pas complètement.

11127 La radiothérapie est un traitement anticancéreux dont bénéficie plus d'un patient sur deux. L'efficacité de la radiothérapie s'explique par la mort des cellules tumorales qui dépend de la dose. Mais l'efficacité antitumorale est plus complexe et dépend aussi du système immunitaire de l'hôte. Les progrès en immunologie ont permis de faire régresser complètement et de façon durable des maladies métastatiques autrefois incurables. La radiothérapie stéréotaxique hypo-fractionnée (radiothérapie délivrée sur des petits volumes avec de fortes doses par fraction) permet l'administration de doses permettant de supprimer les tumeurs et est utilisée pour la prise en charge des tumeurs localisées de petite taille et pour les lésions métastatiques. Elle permet d'appliquer des doses par fraction élevées avec des taux de réponse antitumorale importants.

De plus les combinaisons associant de la radiothérapie et de l'immunothérapie montrent une amélioration de l'efficacité de la radiothérapie et de l'immunothérapie sans majorer les effets indésirables. Lorsqu'on délivre une dose adéquate, une inflammation est générée favorisant ensuite l'infiltration de cellules immunitaires. Une grande partie de l'efficacité de la radiothérapie s'explique par l'action de lymphocytes tueurs, cellules clefs de l'immunité adaptative. La radiothérapie génère également une réponse dite immunosuppressive via l'action et le recrutement de cellules de la réponse immunitaire innée d'origine myéloïde qui peuvent contrebalancer et limiter la réponse adaptative des lymphocytes tueurs. L'efficacité systémique de la radiothérapie varie selon la dose et la dose par séance.

Le système immunitaire joue donc un rôle fondamental dans la progression tumorale ainsi que dans la réponse à la radiothérapie. Ce projet a pour objectif de décrypter *in vivo* le recrutement et le rôle

des cellules myéloïdes (monocytes et neutrophiles) dans des tumeurs pulmonaires irradiées en conditions stéréotaxiques chez la souris. Ces tumeurs seront générées chez des souris immunocompétentes sauvages ou transgéniques chez lesquelles le recrutement des cellules myéloïdes est altéré. Les irradiations stéréotaxiques seront réalisées grâce à un système d'irradiation du petit animal permettant des irradiations fractionnées millimétriques en arc-thérapie. La progression tumorale en réponse aux doses ablatives ainsi que le recrutement/infiltration et le rôle des cellules myéloïdes immunosuppressives seront étudiés. La progression tumorale sera quantifiée par imagerie par bioluminescence ou par scanner. Une caractérisation phénotypique des cellules tumorales, des cellules immunitaires infiltrées et des cellules endothéliales sera réalisée par une combinaison d'approches moléculaires à haut-débit et d'imagerie. Ce projet ouvrira des concepts et des pistes thérapeutiques fondamentales pour l'utilisation optimale des doses ablatives et la réponse antitumorale dans ce contexte.

Le nombre total de souris nécessaire au projet est de 2500.

Les procédures expérimentales ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'informations telles que des insectes ou des non-vertébrés qui ne présentent pas d'homologie suffisante avec l'homme pour le système immunitaire et la radiobiologie. Le système immunitaire requiert la synthèse de cellules, leur maturation, leur transport et leur différenciation puis leur modulation par des facteurs que nous ne maîtrisons pas encore aujourd'hui. Aucune technique alternative au modèle animal ne peut remplacer aujourd'hui ce système complexe. La souris est l'animal le plus utilisé dans ce domaine de la recherche avec des résultats qui ont permis à de nombreux traitements d'être testés chez l'homme avec moins de risque et plus de chance de réussite. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Des calculs statistiques sont réalisés en amont et ont été validés par le comité scientifique en charge du suivi de ce projet. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. La limitation de la capacité des souris de satisfaire leurs besoins physiologiques et éthologiques sera limitée au strict minimum en enrichissant leur environnement par du coton ou des nids en carton et en leur permettant de vivre en groupe de 2 à 5 souris. Des mesures seront prises pour mettre fin dans les délais les plus brefs à toute anomalie ou à toute douleur, toute souffrance, toute angoisse ou tout dommage durable constatés qui pourraient être évités en définissant des points limites précis et adaptés. L'euthanasie des animaux sera réalisée selon les méthodes approuvées en limitant le plus possible la douleur, la souffrance et l'angoisse des souris, par une personne compétente de l'établissement utilisateur.

11128 Nos modes de vie (diagnostics médicaux) et la survenue d'événements exceptionnels, tels que des accidents nucléaires ou des attaques terroristes radiologiques, représentent un risque pour les populations exposées aux rayonnements ionisants (RI) qu'il est important d'évaluer. Il existe encore peu d'études sur les effets de ce type d'exposition, à faibles doses, sur les fonctions cérébrales chez l'homme. Certaines d'entre elles suggèrent malgré tout qu'une exposition externe aux RI, au cours du développement du système nerveux central, pendant l'enfance, pourrait entraîner l'apparition de troubles cognitifs persistants à long terme chez l'Homme. Ce domaine de recherche a fait l'objet de peu d'étude par la communauté scientifique. Le but de nos études expérimentales est d'améliorer nos connaissances scientifiques sur les troubles cognitifs susceptibles de survenir suite à une exposition externe du cerveau à des doses de RI faibles à modérées. Dans un projet précédent, les doses d'exposition étaient comprises entre 0.25 et 2 Gy. Les résultats obtenus nécessitent l'exposition d'animaux à une dose supérieure à celle précédemment utilisées afin de mieux comprendre comment les RI impactent le cerveau. Ainsi souhaitons dans ce projet exposer les animaux à une dose de 10 Gy.

Dans cette étude, les conséquences de l'exposition du cerveau de jeunes souris à cette dose de RI sur la mémoire spatiale, à l'âge adulte, seront étudiées, vs un groupe contrôle. Le test de mémoire qui sera mis en place permettra d'évaluer l'intégrité du fonctionnement d'une structure cérébrale :

l'hippocampe ; et, plus précisément, d'un phénomène biologique se déroulant en son sein : la neurogénèse adulte, après exposition aux RI. Par la comparaison des résultats obtenus avec nos deux modèles d'exposition aux RI : un modèle d'irradiation du cerveau entier vs un modèle d'irradiation localisé du gyrus denté de l'hippocampe dorsal, le rôle spécifique de cette sous structure cérébrale (où se déroule la neurogénèse) dans l'apparition de troubles de la mémoire spatiale, après irradiation, pourra être évalué. Puis, toujours en utilisant en parallèle ces deux modèles d'irradiation, les effets directs et indirects des RI sur le gyrus denté pourront être décryptés, au niveau moléculaire et cellulaire. La dose d'exposition utilisée dans cette étude expérimentale ne doit pas engendrer de souffrance chez les animaux. Ils seront malgré tout observés quotidiennement afin de vérifier leur bien-être.

Pour la réalisation de cette étude 108 souris mâles âgées de 10 jours seront utilisées sur une période de 3 ans. L'utilisation d'animaux est indispensable à la mise en place de tests comportementaux permettant d'étudier les fonctions cognitives. L'approche expérimentale que nous souhaitons mettre en place nécessitera pour chaque dose d'irradiation l'utilisation de deux groupes d'animaux (champ large du cerveau vs irradiation stéréotaxique). Cette approche permettra de prendre en considération le fonctionnement intégré du cerveau dans l'apparition de ces troubles. De nouvelles réponses scientifiques quant aux mécanismes biologiques sous-tendant ses troubles ainsi que la manière dont les RI impactent le cerveau ou une sous structure cérébrale seront alors apportés. Afin de répondre au type de questions scientifiques soulevées dans ce projet, il n'existe pas de test *in vitro* substitutif.

Dans l'objectif de répondre à l'exigence des 3R nous choisirons pour chaque expérimentation un nombre d'animaux permettant d'avoir une bonne puissance statistique pour obtenir des résultats scientifiques robustes sans avoir à effectuer de nouvelles expérimentations. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum l'inconfort ou le stress chez les animaux (suivi des animaux pendant et après les procédures, hébergement en groupe avec enrichissement, maintien au chaud des animaux suite à anesthésie).

11129 Chez le porc, la grippe est une affection virale due à des virus Influenza A très fréquente et très pénalisante pour la filière. On estime que près de la moitié des élevages en France sont concernés par la grippe et plus de 30% sont concernés par une forme récurrente au sein de l'élevage s'exprimant sous forme d'infections répétées survenant systématiquement sur toutes les bandes à un âge déterminé. La grippe du porc est aussi une zoonose, les virus influenza porcins ayant un potentiel de transmission à l'Homme avéré. La circulation permanente et parfois concomitante de différents virus Influenza A au sein des élevages, notamment dans le contexte de grippe récurrente, favorise à la fois l'exposition de l'Homme et les phénomènes de réassortiments génomiques viraux, lesquels peuvent conduire à l'émergence de nouveaux virus à potentiel zoonotique accru. L'évaluation de mesures de maîtrise lors de précédents travaux a montré une faible efficacité de la seule vaccination des reproducteurs et une efficacité beaucoup plus importante d'une externalisation de bandes entières au sevrage (transfert de la bande entière dans un autre élevage de post-sevrage), le nombre de bandes à externaliser étant fonction du type de conduite. Cependant ces externalisations ne peuvent être mises en place dans tous les élevages pour des raisons pratiques. L'objectif de cette étude expérimentale est l'évaluation de l'efficacité de la vaccination chez les porcs en croissance en substitution à l'externalisation de bandes entières dans les élevages ne pouvant le faire. Pour ce faire, la connaissance de l'efficacité vaccinale en termes de réduction de la transmission virale est un prérequis essentiel, et nécessite de passer par des expériences de transmission sur l'espèce cible pour ce virus. Il est de plus possible que dans un contexte de circulation permanente des virus influenza chez les reproducteurs et/ou d'une vaccination des reproducteurs, les niveaux d'anticorps maternels chez les issus soient tels qu'il y ait une inhibition de la réponse vaccinale. L'objectif du projet est donc d'évaluer l'efficacité d'une vaccination à l'aide d'un vaccin commercial inactivé en injection unique au sevrage vis-à-vis de l'infection et de la transmission d'un virus de sous-type H1avN1 chez porcelets EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiés) ayant ou non des anticorps d'origine maternelle (effectif total de 56 porcelets). Le projet permettra une estimation du potentiel de transmission du virus des

porcelets infectés à des porcelets contacts vaccinés en présence ou non d'immunité passive. Les expérimentations seront conduites dans le respect de l'éthique et du bien-être des animaux. En particulier, le nombre d'animaux utilisés sera le plus faible possible tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement robustes. Les porcs seront hébergés dans des animaleries de niveau de biosécurité A3 sous filtration d'air, dans des parcs collectifs de 5 à 6 porcs. Les parcs contiennent divers « jouets » en tant que matériaux d'enrichissement du milieu. Le suivi des animaux implique une visite quotidienne voire biquotidienne à la suite de l'inoculation. Au cours de ces visites, les animaliers procèdent à un examen clinique des animaux ainsi qu'à une prise de température rectale individuelle systématique.

11130 La dermatite de contact est une éruption cutanée localisée ou une irritation de la peau provoquée par le contact avec une substance étrangère. Les patients présentent une inflammation de la peau avec notamment une infiltration de cellules immunitaires, et des niveaux d'anticorps anormaux dans le sang. Afin de mimer cette maladie, nous utilisons un modèle de souris d'hypersensibilité de contact générant une dermatite allergique de contact par l'application cutanée d'une substance spécifique qui provoque cette allergie.

Dans ce projet, nous souhaitons utiliser ce modèle de dermatite allergique de contact chez des souris mutées pour des gènes d'intérêts qui pourraient représenter des cibles thérapeutiques. Ces animaux seront dans un premier temps sensibilisés via l'application d'une substance spécifique au niveau de la peau de l'abdomen, puis 6 jours plus tard, cette même substance sera appliquée au niveau de la peau de l'oreille. Vingt-quatre heures plus tard, l'épaisseur de l'oreille sera mesurée pour évaluer le gonflement de la peau, puis les échantillons seront collectés et la réponse immunitaire sera caractérisée au niveau cellulaire et moléculaire. Nous analyserons en particulier l'épaississement de l'épiderme et l'infiltration des cellules immunitaires au niveau des oreilles des animaux, dans l'espoir d'identifier si l'absence de certains gènes aboutit à une diminution de la réaction allergique.

Remplacement : Les phénomènes à l'œuvre dans cette réaction immunitaire nécessitent deux phases distinctes, de sensibilisation et de déclenchement, et mettent en jeu différents organes et plusieurs types cellulaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour comprendre cette réponse inflammatoire et identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Réduction : Ce protocole sera appliqué à un total de 8 lignées de souris génétiquement modifiées afin d'identifier les rôles de différentes molécules dans la réponse immunitaire. Chaque lignée sera constituée de douze animaux transgéniques et douze animaux contrôles, pour un total de 192 animaux. Cet effectif est l'effectif minimal par lignée qui nous permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différents paramètres mesurés.

Raffinement : l'administration de la substance se fait par application cutanée, ce qui nécessite une anesthésie gazeuse légère. Cette application peut être accompagnée de légères démangeaisons qui s'estompent quelques heures après le traitement. La surveillance des animaux aura lieu tous les jours durant la phase de sensibilisation, puis tous les 3 jours jusqu'à la phase de réexposition à la substance. La surveillance sera visuelle, avec un suivi de l'aspect général de l'animal, de sa posture et de son comportement. D'après notre expérience, aucun dommage important n'est attendu chez ces animaux, néanmoins si un animal présente un dos vouté, un pelage hérissé ou est inactif après stimulation, il sera retiré de l'étude et pourra bénéficier de soins après l'avis du vétérinaire. Si le cas est plus grave (blessure/lésion importante par exemple), l'animal sera euthanasié immédiatement.

11131 La notion que les systèmes nerveux, endocrinien (la combinaison des deux s'appelle le système neuroendocrinien) et immunitaire interagissent, échangent des informations et contrôlent réciproquement leurs activités est encore assez nouvelle, mais il est maintenant admis que le cerveau peut jouer un rôle régulateur sur l'immunité, et inversement les cellules immunitaires peuvent influencer l'activité neuronale. Par exemple, il est avéré que les personnes anxieuses ou stressées ont plus de risques de développer une maladie virale ou un cancer. Le système neuroendocrinien agit soit en relarguant des hormones dans le sang, qui vont circuler et diffuser

dans les tissus, soit par le biais de la libération de neurotransmetteurs par les terminaisons nerveuses, directement dans les tissus. Tous les organes du corps humains sont irrigués et innervés, et les capillaires et terminaisons nerveuses peuvent être à proximité des cellules immunitaires qui sont elles aussi présentes dans tous les organes, comme des gardiens de nos tissus. Ces interactions entre systèmes neuroendocrinien et immunitaire permettent de maintenir l'homéostasie immunitaire, c'est-à-dire un certain équilibre, car un excès ou un manque d'activité du système immunitaire peut entraîner l'apparition de maladies.

Deux axes neuroendocriniens représentent les principales voies d'échanges entre le cerveau et le système immunitaire : l'axe HPA (hypothalamo-hypophysio-surrénalien) et l'axe sympathique. L'axe HPA induit la libération de glucocorticoïdes (abrégiés GCs) dans la circulation et l'axe sympathique provoque la libération de noradrénaline et d'adrénaline (abrégié nor/adrénaline pour plus de clarté) dans la circulation ou directement dans les tissus. A l'état basal les GCs sont sécrétés selon un rythme circadien et permettent une synchronisation optimale des processus physiologiques et comportementaux avec l'environnement extérieur. La noradrénaline et l'adrénaline sont aussi sécrétées pour maintenir l'homéostasie. Les GCs et la nor/adrénaline sont par ailleurs les deux principales neurohormones induites par le stress. Le stress peut être psychologique mais aussi inflammatoire ou infectieux. En effet, une infection bactérienne par exemple va induire une réaction des tissus cibles, avec une production de molécules néfastes de la part de différentes cellules, un changement qui va être perçu comme un stress par le système nerveux. Un stress, quel qu'il soit, va induire une réponse rapide de la part d'une multitude de cellules (immunitaires mais aussi musculaires, cardiaques etc...), qui vont permettre une réponse physiologique globale et adaptée.

Les cellules lymphoïdes innées (abrégiées ILCs) sont des cellules récemment découvertes, qui jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et dans la défense précoce contre les infections. Ces cellules sont particulièrement présentes aux interfaces environnementales telles que la peau, les poumons, l'intestin, mais sont aussi présentes dans le foie et la rate. Elles sont capables de réagir rapidement à tout signal ou changement provenant de l'environnement. Notre projet s'intéresse à étudier la réponse de ces cellules aux neurohormones du stress que sont les GCs et la nor/adrénaline. En d'autres termes, nous voulons comprendre comment ces neurohormones de stress régulent la fonction des ILCs.

Les ILCs expriment le récepteur aux GCs ainsi que le récepteur à la nor/adrénaline. Nous avons donc généré des modèles de souris dans lesquels le récepteur aux GCs ou le récepteur à la nor/adrénaline est supprimé sélectivement et uniquement dans les ILCs. Dans ces souris, les ILCs ne pourront donc pas intégrer le signal de stress (GCs ou nor/adrénaline) et ne pourront donc pas y répondre. Pour étudier l'effet plus global de la nor/adrénaline, nous aurons aussi des souris dans lesquelles le récepteur à la nor/adrénaline est supprimé sur toutes les cellules de l'organisme. Nous comparerons la réponse immunitaire des souris mutées et des souris normales lors de différents stress pathologiques. Pour imiter une infection bactérienne systémique, nous injecterons les souris avec du lipopolysaccharides (abrégié LPS), qui compose normalement l'enveloppe des bactéries pathogènes. Pour étudier les effets d'une infection virale systémique, nous infecterons les souris avec le cytomégalovirus murin (MCMV), qui mime les effets d'une infection avec le cytomégalovirus chez l'homme.

Enfin, dans une approche complémentaire, pour comprendre le rôle de la nor/adrénaline dans la régulation de la fonction des ILCs nous allons utiliser un modèle qui nous permet d'induire un stress chronique chez la souris. Nous allons stimuler le récepteur à la nor/adrénaline par l'administration à court ou long terme de Clenbuterol, une molécule qui mime les effets de la nor/adrénaline en se fixant à son récepteur. Nous étudierons donc les effets sur le système immunitaire d'un stress chronique.

L'importance et la complexité des nombreuses interactions cellulaires nécessaires à la mise en place d'une réponse immunitaire suite à une infection justifient l'utilisation de modèles d'études *in vivo*.

Nous estimons que pour répondre convenablement aux réponses scientifiques soulevées, le nombre total de souris nécessaires s'élèverait à 8730 souris. Les effectifs d'animaux nécessaires

seront réduits au minimum selon la loi des 3R. Des lots de 5 souris seront constitués pour chaque condition, chaque groupe et chaque temps testés afin de répondre aux exigences de test statistique de rang non paramétrique. Les expériences seront reproduites au moins 2 fois afin de s'assurer de la reproductibilité biologique des résultats. Les souris seront hébergées en cages standard sur portoirs ventilés avec de la sciure de bois comme litière, des rouleaux de coton comme matériau de nidification et de maisons de souris comme enrichissement environnemental. Les souris seront hébergées par groupe maximum de 5 individus, auront un accès *ad libitum* à un bidon d'eau, à un régime alimentaire standard et seront libres de leur déplacement. Selon la procédure expérimentale, une anesthésie légère au gaz vetisoflurane ou une anesthésie générale classique combinant narcotique, myorelaxant et analgésique mineur sera administrée aux animaux. Cependant, les analgésiques ayant un effet immunomodulateur, nous ne pourrions en utiliser en complément ni en pré-opératoire ni en post-opératoire sans compromettre les résultats de l'étude du rôle immunomodulateur des GCs. Toutefois, pour le confort, le maintien de leur température corporelle et l'aide au réveil, toutes les chirurgies longues seront réalisées sur un(e) plaque/tapis chauffant(e).

11132 Les risques cardiovasculaires liés à une exposition chronique à faibles doses, comme dans les cas de situations post-accidentelles, ne sont pas encore clairs ; ceci est dû à la difficulté des études épidémiologiques de mettre en évidence une corrélation directe entre les effets biologiques et la dose délivrée au corps humain. Dans ce contexte il y a certaines questions qui sont soulevées au regard des maladies cardiovasculaires : Est-ce que les faibles doses de rayonnements ionisants induisent des effets sur le système cardiovasculaire ? Si oui, est-ce que cette réponse est délétère ou non ?

Les résultats expérimentaux obtenus jusqu'à présent sur l'effet de faibles doses de rayonnements ionisants sur les pathologies vasculaires mettent en évidence que les très faibles doses n'entraînent pas de potentialisation de l'athérosclérose. L'objectif d'un de nos projets est d'identifier l'effet d'une exposition chronique à de faibles doses de rayonnements ionisants sur un autre processus vasculaire : le processus de formation des vaisseaux (ou vasculogénèse). En effet, ce processus n'a jamais été étudié après exposition chronique à faibles doses et pourrait être complémentaire aux études réalisées préalablement sur l'athérosclérose. Ce protocole vient en complément d'une étude déjà initiée au laboratoire sur le processus de vasculogénèse. L'objectif de ce projet est d'identifier la capacité des cellules mononucléées issues de la moelle de souris contaminées dans le cadre d'un autre projet à former des structures tubulaires dans du matrigel implanté chez une souris receveuse.

Pour cela les cellules mononucléées de la moelle osseuse de souris C57BL/6J contaminées au ¹³⁷Cs par eau de boisson dans le cadre d'un autre projet conduit au laboratoire vont être isolées et injectées en partie dans du matrigel qui sera implanté en dorsal chez des souris receveuses de même souche.

Ce projet comprend 1 procédure utilisant au total 90 souris C57BL/6J receveuse, les souris donneuses de moelle osseuse étant déjà incluses dans un projet déjà autorisé.

La conception de ce projet répond aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement relatives à l'expérimentation animale. Le nombre de souris choisi pour ce protocole est réduit mais suffisant pour exploiter les résultats obtenus d'un point de vue statistique.

L'étude des paramètres physiologiques comme le processus de vasculogénèse requiert l'utilisation d'animaux.

Les études *in vitro* présentent des limites pour l'évaluation de paramètres physiologique et/ou physiopathologique sur un processus tel que la vasculogénèse après une exposition chronique à faibles doses. En effet, il est très difficile de maintenir des cultures cellulaires au-delà de 3 semaines. Dans le contexte du bien-être animal, le raffinement viendra du fait que ces animaux seront anesthésiés, prélevés et euthanasiés selon la réglementation en vigueur.

11133 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche

et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

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

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

Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'assurer de la sécurité et des performances des produits de santé utilisés en orthopédie (évaluation de l'intégration osseuse, propriétés biomécaniques). Les petits ruminants, les lagomorphes et les rongeurs sont alors des modèles privilégiés étant donné les similitudes reconnues avec l'organisme humain. L'utilisation du modèle canin est également envisageable dans des cas exceptionnels, mais elle reste très rare pour raison éthique.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal).

Par an, jusqu'à 540 animaux peuvent être utilisés dans le cadre de ce projet (180 rats, 200 lapins, 20 chiens, 20 porcins, 100 ovins et 20 caprins).

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

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

11134 Ce projet a pour objectif d'utiliser la thérapie cellulaire pour améliorer la gestion médicale des victimes d'une exposition nucléaire ou le public après un acte de malveillance ou un accident nucléaire. Les symptômes majeurs (appelé syndrome hématopoiétique) consistent en des

saignements et des infections pouvant aboutir à la mort. L'innovation technologique de cette décennie est de pouvoir obtenir des cellules souches adultes chez l'homme (hiPS, Human Induced Pluripotent Stem Cell, cellules humaines induites à la pluripotence) à partir de cellules différenciées. La greffe de cellules souches issues de banque d'hiPS est une option prometteuse pour le futur, les premiers essais cliniques ont débuté. La constitution de banques IPS de grade clinique est en cours de développement. Elles permettront d'utiliser les hiPS comme source de cellules souches pour la thérapie cellulaire pour une grande proportion de la population avec un nombre très limité de cellules issues de donneurs « universels ». Nous avons obtenu un protocole proche de la qualité clinique de production de cellules souches hématopoïétiques fonctionnelles à partir d'hiPSc sécurisée de manière reproductible pour 3 donneurs sains et 2 donneurs leucémiques. Notre objectif est de maintenant de progresser jusqu'à un protocole de production en milieu industriel d'un greffon hématopoïétique. Afin de disposer d'un produit de thérapie cellulaire utilisable en clinique nous retenons l'approche de valider un greffon cellules souches hématopoïétiques produit à partir d'hiPSc, congelé et prêt à l'emploi, parfaitement caractérisé biologiquement et réglementairement pour permettre le traitement des patients. Pour évaluer la capacité à reconstituer une hématopoïèse complète et fonctionnelle, il est nécessaire d'utiliser un modèle intégré in vivo. De plus l'effet de ces traitements pour qu'ils soient pertinents nécessitent leur interaction avec les différents compartiments de l'hématopoïèse, condition retrouvée chez le modèle animal intégré. La mise en place de ce protocole sera évaluée chez la souris humanisée NSG et si nécessaire sur d'autres modèles de souris immunotolérantes permettant de soutenir une hématopoïèse humaine. L'effectif nécessaire à cette étude est de 1800 souris sur 5 ans.

Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux animaux (souris immunodéprimées : hébergement en IVC, procédures de manipulations) et aux procédures réalisées afin de limiter au minimum l'inconfort ou le stress chez les animaux (suivi des animaux pendant et après les procédures, hébergement en groupe avec enrichissement, application de points limites spécifiques). Les perspectives seront d'appliquer les résultats découlant de ce projet ambitieux et novateur à d'autres pathologies.

11135 Il existe plus de 200 maladies neuromusculaires, presque toutes d'origine génétique. Généralement, un gène est altéré et ne peut pas remplir sa fonction normale. Les traitements utilisés sont essentiellement tournés vers la prévention des complications engendrées par la maladie, et ce n'est que très récemment que le premier traitement curatif est devenu accessible pour l'Amyotrophie Spinale Infantile qui représente la première cause génétique de mortalité infantile en France. La thérapie génique est une approche thérapeutique communément testée pour ces maladies : elle consiste à apporter dans les cellules malades un gène normal afin de remplir la fonction déficiente. Utiliser des vecteurs d'origine virale pour délivrer ce gène médicament dans le muscle est une stratégie de choix pour traiter ces maladies, comme en témoignent les premiers résultats d'essai clinique sur une myopathie. Mais cette approche se heurte à ce jour à des limitations qu'il est indispensable de résoudre. 1) Il est nécessaire d'administrer de très grandes quantités de vecteur pour cibler efficacement le muscle en une seule fois, ce qui pose des problèmes de production et pourrait engendrer des effets secondaires en raison de la grande quantité administrée ; 2) la ré-administration des vecteurs n'est pas possible à cause de la réaction immunitaire que les vecteurs engendrent lors de la première administration, réduisant ainsi la possibilité de pallier un éventuel échec thérapeutique ou d'étaler les injections dans le temps. Ici, notre but est de faire la preuve de principe qu'il est possible d'agir sur ce levier en utilisant un composé qui puisse permettre de réinjecter le vecteur médicament. Antérieurement, nous avons montré l'efficacité de ce composé sur le contrôle de la réponse immunitaire dans le cadre de la thérapie génique de maladies du foie, mais des problématiques différentes existent pour le muscle en particulier concernant le ciblage et la quantité de vecteur administrée. Nous allons tester l'efficacité de ce composé sur le contrôle de la réponse immune suite à l'administration d'un vecteur en faisant varier la dose de vecteur, la fréquence d'administration du composé, et en testant la possibilité de ré-administrer le vecteur pour améliorer l'expression du gène médicament.

Il est impossible d'utiliser un modèle cellulaire pour mesurer des effets sur la réponse immunitaire, qui nécessite un système physiologique (pas de remplacement). A l'inverse, la souris développe une réponse immunitaire contre les vecteurs qui permet de tester les stratégies thérapeutiques. De plus, la preuve de principe de la thérapie génique du muscle par vecteur a été faite dans cette espèce.

Dans le respect de la règle des 3R, nous allons réduire le nombre d'animaux à son minimum en : 1) utilisant une seule molécule dont l'efficacité a déjà été démontrée dans d'autres contextes, 2) utilisant le minimum d'animaux possibles pour avoir une approche statistiquement interprétable, 3) réalisant une analyse longitudinale sur les mêmes animaux, 4) optimisant l'utilisation des animaux en collectant en plus des informations nécessaires à l'étude, un maximum d'informations pour préparer le protocole suivant et limiter l'inclusion additionnelle d'animaux. Afin de raffiner nos expériences, plusieurs techniques complémentaires d'analyses biochimiques, immunologiques et d'imagerie seront aussi utilisées pour optimiser les mesures et les analyses, et ainsi obtenir plus d'informations pertinentes sans majorer le stress, l'inconfort et la souffrance animale. Nous nous attacherons également, dans un souci éthique, à faire en sorte de limiter le stress des souris lors des différents prélèvements par utilisation d'anesthésiques. Les vecteurs apportés vont entraîner une réponse immunitaire sans conséquences pathologiques pour les souris. De plus, la molécule testée pour réduire la réponse immune ne devrait pas induire de dommages supplémentaires : des études de toxicité ont déjà été réalisées par ailleurs afin de réaliser des essais cliniques. La surveillance quotidienne des animaux sera appliquée et une grille d'évaluation sera incluse dans l'étude pour prendre en compte des éventuelles manifestations d'inconforts.

Le nombre de souris nécessaire a été estimé à 10 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes). Notre projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation totale de 270 souris.

11136 La myopathie à némaline (NM), aussi appelée myopathie à bâtonnets, est une maladie héréditaire touchant les muscles avec une sévérité variable. Cette pathologie, qui touche 1 personne sur 50000, ne bénéficie à l'heure actuelle d'aucun traitement et se traduit dans la majorité des cas par un décès à un âge précoce. Cette pathologie est due à des mutations localisées dans une dizaine de gènes, dont le gène codant pour la protéine : α -actine squelettique (ACTA1). L' α -actine squelettique est la forme de l'actine présente dans les muscles squelettiques. Elle forme les filaments fins d'actine qui sont un des éléments les plus abondants de la cellule. L'actine et ces protéines associées permettent le maintien de la structure de la fibre musculaire. Dans le cas de la myopathie à némaline, les mutations du gène ACTA1 sont dominantes, c'est-à-dire que l'on retrouve dans la cellule la protéine sous sa forme mutée (50%) mais aussi non mutée (50%).

La protéine mutée est non fonctionnelle et ne permet pas la formation des filaments fins d'actine. La protéine se retrouve alors dans des agrégats dans les cellules musculaires ainsi que ces protéines partenaires. La cellule musculaire ne fonctionne donc plus normalement, la capacité de contraction des muscles est diminuée.

Des études faites chez les patients et dans le modèle murin de la maladie ont montrées un lien entre la sévérité de la maladie et le ratio protéine mutée vs protéines non mutée. Dans le but de traiter la myopathie à némaline liée à l'actine, nous souhaitons diminuer la quantité de protéine mutée présente dans les muscles afin d'observer une correction de la maladie.

A ce jour, il n'existe pas de modèle cellulaire de la maladie (les cellules en culture ne survivent pas). A l'inverse, les modèles murins de la maladie reproduisent bien les aspects cliniques de la maladie humaine (faiblesse musculaire, présence d'agrégats protéiques dans les fibres musculaires, réduction de l'espérance de vie). Afin de vérifier l'efficacité de nos molécules, il est important d'utiliser un organisme entier chez lequel nous pourrions mesurer l'effet au niveau de l'organe et mesurer la force musculaire. Il n'y a pas de remplacement possible.

L'efficacité relative des molécules a été testée en premier sur des cellules normales en culture, et seules les molécules les plus efficaces seront administrées aux souris, ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés. En effet, nous avons commencé notre projet en introduisant dans des

cellules normales de l'actine mutée et saine marqués à l'aide de traceur. Nous avons ensuite déterminé l'efficacité de nos molécules par la mesure de ces traceurs. Les molécules sélectionnées pour des études *in vivo* ont permis de diminuer le plus le traceur lié à l'actine mutée sans agir sur le traceur lié à l'actine normale. Ce type de criblage nous a permis de réduire la quantité de souris utilisées (environ 240 souris) puisque nous avons testées 6 molécules candidates et sélectionnées finalement 3 pour réaliser les études *in vivo*.

Afin de raffiner nos études, nous utiliserons des anesthésiques et analgésiques (molécules antidouleurs) pour prévenir la douleur éventuelle générée lors des injections intramusculaires. Lors des analyses qui permettront de vérifier que nos traitements améliorent la fonction du muscle, l'animal recevra une injection d'analgésique de type morphinique ce qui permettra de soulager les douleurs intenses éventuelles. L'animal sera également disposé sur un tapis chauffant tout au long de l'anesthésie lors de ces mesures. Par ailleurs, une alimentation spécifique hydratante et nourrissante sera placée au sol dans la cage afin de faciliter l'accès aux souris malades qui présentent un défaut de motricité. Par ailleurs, les infections oculaires qui peuvent accompagner la maladie seront traitées avec une pommade oculaire d'antibiotiques.

Les molécules thérapeutiques apportées ne devraient pas entraîner une réponse immunitaire importante (vecteur AAV recombinant exempt de pouvoir pathogène et séquence de shRNA non immunogène) et seront véhiculées dans un tampon salin neutre : elles ne devraient donc pas créer de dommages supplémentaires aux souris modèles. Un bénéfice thérapeutique est au contraire attendu : il devrait être plus ou moins important en fonction de l'efficacité des molécules.

Le nombre de souris nécessaire a été estimé à 12 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes). Les souris seront élevées et reproduites dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation totale de 486 souris.

11137 Tout expérimentateur est amené à acquérir, entretenir ou perfectionner les techniques nécessaires à la mise en œuvre de projets autorisés utilisant des animaux à des fins scientifiques. Ce projet est dédié exclusivement à l'entraînement du personnel sur les gestes techniques nécessaires à la bonne réalisation des études pharmacologiques *in vivo*. Ce projet a pour but de permettre au personnel expérimentateur de consolider ses compétences techniques sur des gestes déjà maîtrisés dans l'équipe et qui sont ou ont été mis en œuvre dans le cadre d'autres projets autorisés ou d'en acquérir de nouvelles. Par ailleurs, cela répond à une obligation réglementaire. Enfin et surtout, la maîtrise du geste technique par l'expérimentateur contribue au bien-être animal en réduisant les risques de stress et de douleur pour l'animal.

Malgré de nombreuses recherches, aucun modèle de substitution à l'animal n'est encore suffisamment sophistiqué pour exercer ces entraînements. Il n'y a donc pas d'autres choix, actuellement, que de les réaliser sur des souris anesthésiées ou vigiles.

En cancérologie, la recherche de nouveaux candidats médicaments nécessite la réalisation d'administrations chroniques et aiguës en intraveineuse, intrapéritonéale et per os chez la souris pour évaluer nos composés. L'évaluation de l'efficacité de ces candidats sur les tumeurs requiert des implantations (greffes) en sous-cutanée, intradermiques et intramammaires pour la mise en place de modèles de xénogreffe ou d'allogreffe de tumeurs humaines ou murines ainsi que des prélèvements sanguins, sur animaux vigiles ou anesthésiés, pour les études de pharmacocinétique ou les analyses hématologiques. Ces études nécessitent également des autopsies à leur issue et des prélèvements d'organes/tumeurs pour les études pharmacodynamiques et les analyses *ex vivo*. Tous ces gestes doivent donc être parfaitement maîtrisés par le personnel impliqué dans les études.

Les gestes techniques, comme les prélèvements sanguins, par exemple, ne peuvent à l'heure actuelle être correctement totalement acquis autrement que chez un animal vivant, les moyens de substitution étant encore insuffisamment similaires à l'organisme vivant et ne pouvant constituer qu'une étape préliminaire à cette acquisition.

Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont en majorité issus d'un premier projet permettant leur réutilisation. Dans notre axe de recherche en oncologie, il s'agit généralement d'animaux greffés non traités, non inclus après les étapes de randomisation ou d'animaux témoins sains non

traités issus d'études pharmacologiques. Cette réutilisation des animaux permet de valoriser les animaux inclus dans les études et contribue fortement à la règle des 3R par la réduction du nombre d'animaux. Leur réutilisation sera encadrée par avis vétérinaire ou SBEA en délégation afin d'assurer un bon état général leur permettant d'être intégrées dans ce projet. La plupart des gestes réalisés sont non invasifs, peu stressants et ne nécessitent pas d'anesthésie générale. Pour quelques cas particuliers, impliquant par exemple certains prélèvements sanguins, une anesthésie générale sera effectuée afin de limiter toute souffrance. De plus les prélèvements sanguins non terminaux respecteront les volumes sanguins physiologiques et durées minimales de récupération pour les souris (selon les recommandations européennes actuelles).

Les souris en cours d'expérimentation feront l'objet d'un suivi clinique spécifique par les expérimentateurs et les zootechniciens de façon quotidienne. Ce suivi sera complété d'une évaluation de la taille et de la croissance des tumeurs portées sous la peau par les souris dans le cas où elles auraient été greffées au préalable de leur réutilisation dans ce projet, au minimum 2 à 3 fois par semaine pour anticiper l'atteinte des points limites spécifiques (volume, aspect, ...).

Les souris seront soit immunocompétentes (c'est-à-dire avec un système immunitaire parfaitement fonctionnel), soit immunodéprimées (c'est-à-dire avec système immunitaire déficient voir totalement absent), en fonction du premier projet autorisé réalisé sur ces souris.

Les souris immunodéprimées étant extrêmement sensibles à l'environnement extérieur, elles seront protégées dans un secteur à confinement spécifique avec des procédures d'accès, des conditions d'hébergement et de manipulation strictes appliquées par tout le personnel y intervenant, afin de prévenir tout risque de contamination.

Les souris seront hébergées en groupes sociaux tout au long des entraînements, dans des cages enrichies de « cocoon » pour favoriser leur instinct de nidification. Cet enrichissement va également permettre de surveiller leur état général par observation de leur comportement vis-à-vis de cet enrichissement.

Compte tenu du nombre d'entraînement envisagé par an, on pense utiliser 1050 animaux dans le cadre de ce projet (5 ans), dont les 2/3 à minima seront réutilisés de projets précédents.

11138 Dans un contexte où le bien-être des animaux est au cœur des préoccupations des citoyens européens, il est nécessaire de poursuivre les études qui visent à améliorer les conditions d'élevage des animaux, la relation homme-animal et qui facilitent le travail des manipulateurs. Des premières études montrent l'importance de la communication sensorielle entre les espèces en particulier la communication olfactive entre l'homme et l'animal. Lorsque l'homme est stressé, des molécules odorantes se retrouvent dans la sueur. Notre projet consiste à observer l'impact des odeurs de stress humain collectées dans la sueur sur le comportement des animaux. Pour cela des odeurs « neutres » et des odeurs de stress seront récoltées sur des étudiants durant un cours magistral (émotion neutre) et un partiel (stress). Ces odeurs seront ensuite présentées à des souris afin d'observer leurs réactions comportementales. L'hypothèse de ce projet est que les souris sont capables de percevoir le stress du manipulateur et que ce stress modifie leur comportement.

Ce projet sera réalisé sur 20 souris. Nous avons réduit le nombre d'animaux au seuil nécessaire pour pallier la variabilité interindividuelle observée lors des expérimentations en comportement. De plus, chaque animal sera son propre contrôle, chaque animal sera donc exposé à l'odeur humaine « émotion neutre », à l'odeur humaine expérimentale (« stress ») et à l'eau (témoin). Afin de diminuer le stress des animaux à la manipulation et au dispositif expérimental, les animaux seront au préalable habitués une demi-journée en groupe puis individuellement dans les cages d'enregistrement de l'activité locomotrice. L'utilisation des animaux dans l'étude des relations homme-animal est nécessaire. Aucun modèle de substitution n'est à l'heure actuelle disponible.

11139 Le mélanome est un cancer issu des mélanocytes, cellules qui sécrètent le pigment appelé mélanine. Chez certaines espèces comme l'homme et le chien, les mélanomes peuvent conduire rapidement à la mort. Par contre, le porc MeLiM, développe spontanément des mélanomes cutanés, dont la moitié avant la naissance, qui disparaissent spontanément et totalement au bout de

quelques semaines. *In vitro* les cellules de mélanome du porc MeLiM prolifèrent avec des caractéristiques presque identiques à celles des cellules cancéreuses de sorte que l'on s'interroge sur leur malignité et du rôle du système immunitaire de l'hôte dans la régression.

La greffe de cellules représente le moyen usuel pour en tester la malignité : les cellules malignes se multiplient et les tumeurs malignes se développent après transplantation successive sur l'animal.

Nous proposons donc de tester la malignité des cellules de mélanome de MeLiM *in vivo* en utilisant des souris porteuses d'un système immunitaire déficient permettant d'éviter le rejet de la greffe. Cette étude permettra notamment de vérifier si, dans un organisme dépourvu de système immunitaire efficace, la régression tumorale se produit tout comme chez le porc MeLiM. Le nombre d'animaux utilisé dans ce projet est estimé à 32 souris et sera réduit au strict nécessaire des besoins expérimentaux dès que l'analyse statistique invalidera l'hypothèse initiale. Des souris recevront des cellules mélanocytaires non tumorales de porc comme contrôle négatif. Elles seront élevées en isolateurs en milieu enrichi pour assurer leur bien-être et seront surveillées régulièrement pour déceler n'importe quel changement de leur état général, particulièrement après greffe. La gestion de la douleur sera immédiatement mise en place si des signes d'inconfort apparaissent. Les résultats de ces expériences détermineront l'intérêt du modèle de porc MeLiM pour la recherche des mécanismes d'immuno surveillance et sur les points de contrôle immunitaire dans les cancers humains.

11140 Les patients atteints de cancers localisés au niveau du thorax et traités par radiothérapie peuvent développer des séquelles pulmonaires. Les nouveaux appareils de radiothérapie permettent aujourd'hui de conformer de manière très précise les rayonnements au volume de la tumeur, avec une très grande précision dans le cas de l'irradiation en conditions stéréotaxiques, caractérisée par une imagerie de haute qualité de la tumeur, et la convergence de mini-faisceaux en son centre (faisceaux de quelques millimètres), réduisant ainsi drastiquement le volume irradié.

L'irradiation stéréotaxique est modélisée chez la souris au laboratoire depuis plusieurs années, avec un recul sur les lésions générées par l'exposition à différentes doses uniques et fractionnées. En particulier, nous avons observé un important infiltrat inflammatoire riche en macrophages, qui demeurent au sein du tissu jusqu'à 12 mois après irradiation. L'objectif du projet est d'identifier dans les lésions pulmonaires les différents sous-types de macrophages et leur origine (macrophages résidents ou issus de la circulation sanguine).

La première étape d'identification des sous-types de macrophages se fera sur les échantillons déjà disponibles au laboratoire par immunohistochimie. La seconde étape a pour but de déterminer l'origine tissulaire ou circulante des macrophages. Elle se fera via la mise au point du modèle de parabiose chez la souris. L'espèce choisie est la souris, modèle de référence pour les études précliniques.

Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 40.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Dans le but de comprendre le rôle des macrophages dans le développement des lésions radiques pulmonaires nous sommes dans l'obligation d'utiliser des modèles précliniques *in vivo*. Dans le cadre de la chirurgie réalisée dans le cadre de ce projet, les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ainsi que les soins per-opératoires et le suivi post-opératoire seront discutés avec le vétérinaire.

Les études histologiques se feront sur les prélèvements réalisés sur l'animal euthanasié après anesthésie préalable.

11141 Objectifs du projet :

Notre projet porte sur les conséquences à court, moyen et long terme de modifications précoces de l'alimentation, sur la survenue de pathologies cardio-vasculaires (hypertension artérielle, infarctus, insuffisance cardiaque) et métaboliques (surpoids, diabète, dyslipidémies). Pour ce projet, nous utiliserons un modèle de rongeur (souris) soumis à une suralimentation postnatale, induite par une

réduction du nombre de petits par portée (3 au lieu de 9). Au moment du sevrage, tous les animaux recevront une alimentation standard *ad libitum*.

Nous envisageons d'explorer au niveau du tissu cardiaque, quels gènes et quelles protéines voient leur expression modifiée par une modification post-natale du statut nutritionnel. Nous souhaitons d'autre part augmenter notre compréhension de la vulnérabilité du système cardiovasculaire vis-à-vis de situations pathologiques induites *in vivo* ou *ex vivo* (ischémie-reperfusion du myocarde, diabète, insuffisance cardiaque induite par certains médicaments anticancéreux). Enfin, nous souhaitons envisager des possibilités de traitements, nutritionnels ou médicamenteux, susceptibles de limiter les atteintes cardiométaboliques induites par la suralimentation postnatale chez la souris.

Avantages du projet :

Ce modèle est un modèle unique car il permet d'observer comment, en agissant à une période critique du développement des mammifères, celle qui suit immédiatement la naissance, des modifications de l'environnement nutritionnel peuvent agir de manière définitive sur le fonctionnement de différents organes (cerveau, cœur, foie, pancréas, reins, tissu adipeux, ...) et conduire à une plus grande susceptibilité de l'adulte à des pathologies cardiométaboliques. Il se rapproche de situations rencontrées chez l'Homme (nouveaux nés de petit poids avec rattrapage rapide de croissance) et qui prédisposent ensuite l'adulte à un surpoids, une hypertension artérielle, des désordres du métabolisme du glucose et des lipides, qui font ensuite le lit des maladies cardiovasculaires.

Nombre et type d'animaux :

Notre travail engagera au maximum 900 rongeurs (souris) sur 5 ans.

Remplacement, réduction, raffinement :

Ce projet de recherche, qui repose sur des interactions entre différents organes (tissu adipeux, cerveau, foie, cœur et vaisseaux) ne peut malheureusement être approché par des techniques reposant sur la culture cellulaire. Il nécessite d'être conduit sur un animal entier, de sa naissance à sa maturité.

Ne seront utilisés que le nombre d'animaux strictement nécessaire et suffisant à la conduite du projet. La reproduction et l'élevage des animaux se feront dans des cages dont le milieu aura été enrichi, dans un environnement calme et non stressant. Les manipulations non douloureuses (pesées, mesure de la pression artérielle) se feront dans des conditions de calme non stressantes. Toutes les procédures chirurgicales seront accompagnées de l'utilisation d'antalgiques appropriés (lidocaïne locale, buprénorphine injectable) afin d'inhiber la douleur occasionnée. Le suivi post-opératoire sera strictement encadré (réveil et maintien en couveuse, surveillance) afin de détecter des signes précoces de souffrance (aspect physique externe, non réponse comportementales aux stimuli externes, diminution de la fréquence cardiaque et respiratoire.), qui seront éventuellement traités par une nouvelle administration d'antalgiques. Tout animal dont l'état fonctionnel post-opératoire ne s'améliore pas et présente des signes persistants de douleurs sera euthanasié.

11142 Le diagnostic précoce est un enjeu crucial pour la prise en charge et le traitement des maladies neurodégénératives. En effet, ces maladies se développent très lentement, et lorsque les premiers symptômes apparaissent, il est souvent déjà trop tard pour espérer un traitement permettant une rémission voire une guérison. Aujourd'hui, les rares méthodes de détection précoce restent limitées dans leurs applications et sont très coûteuses. Ces méthodes ne peuvent donc pas être utilisées comme outil de dépistage systématique.

Les progrès récents dans le dépistage précoce du cancer reposent sur l'analyse de l'ADN/ARN tumoral circulant dans les liquides corporels. Dans le cas des maladies neurodégénératives, la mort neuronale devrait de la même manière provoquer une fuite d'ADN/ARN neuronal dans les liquides corporels. Nous proposons d'étudier si l'ADN/ARN échappé des cellules neuronales et circulant dans les liquides corporels peut être détecté, refléter la neurodégénérescence et servir de biomarqueur précoce de maladies neurodégénératives. Si ces résultats sont concluants, ils

ouvriront la voie au dépistage fiable, très peu invasif et peu coûteux (donc systématisable), et surtout très précoce des différentes maladies neurodégénératives.

Pour ce faire, nous étudierons l'ADN/ARN circulant dans les liquides corporels de primates non-humains modèles des maladies neurodégénératives, où la progression de la dégénérescence neuronale est bien connue et bien contrôlée (contrairement au cas des études de patients humains). Le modèle primate non-humain se justifie d'une part par la nécessité de détecter de l'ADN/ARN circulant dans les liquides corporels d'un animal qui en dispose en quantité suffisante pour pouvoir utiliser les techniques de détections utilisées chez l'homme – nous nous plaçons en effet dans une démarche strictement translationnelle –, et d'autre part de tester cette détection sur un modèle animal qui reproduit de manière bien contrôlée la progression chez l'humain de la maladie neurodégénérative étudiée.

Les primates non-humains étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité, dans des élevages agréés. Chez un premier animal, nous comparerons la composition et la quantité de fuite d'ADN/ARN neuronal avant, pendant, et après induction d'une forte neurodégénérescence (résultant en une pathologie de type Huntington), puis, si nous détectons avec succès des biomarqueurs de neurodégénérescence dans ce modèle, nous étudierons la fuite d'ADN/ARN neuronal chez deux animaux modèles, l'un d'Alzheimer, l'autre de Parkinson. Le nombre de primates utilisés s'élèvera donc à trois. Les analyses génétiques (par exemple par séquençage à haut débit) qui seront effectuées sur les échantillons de liquides corporels que nous prélèverons régulièrement ($n > 5$ pour chaque animal) avant, pendant, et après induction de la maladie vont générer une grande quantité de données, suffisante pour obtenir des résultats statistiquement concluants. Seul le recours à des modèles animaux des maladies neurodégénératives, où la progression de la pathologie est bien contrôlée, permettra de trancher une fois pour toute si l'ADN circulant peut-être utilisé comme biomarqueur de la progression de ces maladies. Les prélèvements de liquides corporels ne nécessiteront que des techniques indolores. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales (nécessaires pour établir certains modèles des maladies neurodégénératives par transgénèse virale) ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Les protocoles d'intoxication en vue d'induire une maladie neurodégénérative sont bien caractérisés et ont également été validés par une équipe vétérinaire et par des comités d'éthique. L'observation quotidienne de l'aspect et du comportement de chaque animal, et leur hébergement en groupe social permettront de veiller au bien-être des animaux.

11143 La mise en place de cette plateforme d'étude du comportement chez la souris permet d'explorer aussi bien les fonctions comportementales de base que les fonctions cognitives complexes grâce à des paradigmes comportementaux adaptés. La plateforme est uniquement centrée sur le modèle souris qui offre les plus larges potentialités pour l'application des méthodes modernes d'ingénierie génétique et d'étude expérimentale du comportement. Ce plateau technique a pour vocation de permettre la mesure des comportements basiques et des paramètres physiologiques de base (activité motrice, force musculaire, coordination motrice, fatigue), de permettre l'évaluation des fonctions cognitives (activité exploratoire, anxiété, attention, motivation) et des capacités d'apprentissage et de mémoire (mémoire sociale, spatiale, associative...). Ce plateau d'analyse du comportement chez la souris est ouvert à la communauté scientifique et a comme principales missions dans le domaine de l'exploration comportementale, de proposer, de développer et d'adapter des technologies innovantes et compétitives pour répondre aux besoins des utilisateurs, que ce soit dans le cadre de recherches fondamentales ou biomédicales.

Ce plateau s'adresse à tous les chercheurs collaborant pour lier les gènes, les maladies et les traitements avec le comportement et ce dans de nombreuses pathologies (physiologiques, neurologiques, neurodégénératives ou troubles psychiatriques). Actuellement, les recherches en physiologie et/ou biologie intégrative exploitent la connaissance des génomes afin de décortiquer les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les grandes fonctions biologiques. L'analyse comportementale de ces animaux génétiquement modifiés, dont le nombre va croissant, nécessite des compétences spécifiques et des moyens importants. De même, le rôle de nouvelles molécules spécifiques provenant de la pharmacologie classique voir de la génomique ou de la protéomique

doivent impérativement être testé *in vivo* afin de connaître leurs actions sur le comportement et de rechercher d'éventuels effets secondaires sur le comportement des animaux.

De nombreux laboratoires de recherche à la fois publics et privés, et les EPST comme les sociétés privées locales sont fortement intéressées par une offre de prestations comportementales. Nous avons donc voulu développer les outils pour réaliser l'ensemble des explorations comportementales chez la souris et ces outils ont été regroupés au sein d'un même plateau technologique de procédures comportementales.

Le plateau veut proposer d'être le garant éthique dans différentes expériences comportementales classiques proposées. Cette autorisation d'expérimenter concernera uniquement les animaux pris en charge dans l'établissement utilisateur. L'intérêt de cette demande est de simplifier les démarches des concepteurs d'expériences, mais également d'éviter d'avoir à demander une autorisation d'expérimentation à chaque expérience pour une procédure unique, ce qui devrait non seulement faire gagner beaucoup de temps mais également qui devrait éviter une surcharge de travail (parfois très répétitif) pour le comité d'éthique.

Cependant, le plateau ne se portera garant éthiquement que sur des souris n'ayant subi aucune modification génétique pouvant entraîner une gêne ou un handicap particulier pour la souris. Il en est de même pour les souris recevant un traitement pharmacologique pouvant engendrer des modifications comportementales importantes (stress ou autres.). Donc, avant d'accepter d'effectuer des expériences comportementales sur un groupe de souris, nous allons vérifier que les souris ne présentent aucun stress particulier et ni gêne ni handicap. Pour cela, nous allons en premier interroger les concepteurs sur leur modèle et donc sur ces risques potentiels. Puis, tous les groupes de souris seront examinés par notre vétérinaire référent qui fait partie du SBEA. Tous les signes de mal-être seront examinés (postures, texture du poil, poids anormal.) par le vétérinaire et seuls les animaux en parfaite santé et sans aucun signe de stress ou de handicap seront pris en charge par le plateau. Dans le cas contraire, nous demanderons aux concepteurs d'effectuer une demande d'expérimentation propre pour leurs animaux.

Il est bien entendu très difficile voire impossible de prévoir le nombre de clients par an et l'évolution de ce nombre sur les 5 prochaines années, et donc de prévoir le nombre exact d'animaux que nous allons utiliser, ainsi que les génotypes des souris et les traitements effectués. Le nombre de groupes sera fonction du projet qui sera confié au plateau mais le nombre de souris par groupe est généralement compris entre 10 et 12. Basé sur une estimation de l'utilisation actuelle du plateau, le nombre total de souris testées pourra être compris entre 180 et 250 souris par an, soit 900 à 1250 animaux sur 5 ans.

Conformément aux exigences de remplacement, de réduction, le nombre d'animaux utilisés dans le projet est réduit à son minimum pour obtenir dans chaque groupe étudié un nombre d'individus suffisants pour réaliser les tests statistiques. Quand cela est possible, les différentes parties du projet sont regroupées pour réduire le nombre d'animaux observés. La standardisation des procédures permettra d'améliorer la reproductibilité des résultats, ce qui pourrait également conduire à une réduction supplémentaire du nombre d'animaux.

De plus, l'un des objectifs prioritaires du plateau d'analyse du comportement de la souris consiste à raffiner les conditions expérimentales en se basant principalement sur une observation accrue des animaux pendant le déroulement des procédures comportementales. Tout signe de stress ou de souffrance de l'animal pendant une procédure sera contrôlé, afin d'en trouver l'origine potentielle et de modifier les conditions expérimentales en conséquence. Une veille bibliographique et technique permettra également d'optimiser les conditions expérimentales avec pour objectif final une réduction du stress, de la douleur et de la souffrance potentielle de l'animal.

Enfin, pour l'ensemble des procédures proposées par le plateau, les animaux sont manipulés quotidiennement pour une durée minimale de 3 jours avant toute étude comportementale, et ceci dans la pièce où se déroule le test. Cette démarche permet de réduire le stress lié à la manipulation et d'habituer l'animal à l'expérimentateur et aux pièces d'expérimentation.

11144 Ce projet constitue une extension d'un projet déjà autorisé, portant sur l'étude de l'effet des vésicules extracellulaires (VE) sur la régénération tissulaire et vasculaire d'un tissu lésé par exposition aux rayonnements ionisants, dans un cadre à visée thérapeutique.

L'objectif de ce projet complémentaire est d'étudier le rôle de la mobilisation cellulaire dans le processus de réparation tissulaire et vasculaire après irradiation et traitement, au moyen de souris chimères GFP- produisant des cellules hématopoïétiques GFP+.

Les souris GFP- seront exposées à une dose létale d'irradiation en corps entier dans le but de détruire leur système hématopoïétique, puis sont greffées avec de la moelle osseuse de souris donneuses GFP+ afin de le reconstituer. Après 5 à 6 semaines, les souris chimères ainsi obtenues sont intégrées à la procédure n°1 du projet déjà autorisé afin d'évaluer l'utilisation de des vésicules extracellulaires pour le traitement des lésions radio-induites et comme marqueurs d'efficacité thérapeutiques (modèle d'irradiation localisée à la patte).

Pour évaluer le rôle du système vasculaire dans des conditions physiologiques, nous sommes dans l'obligation d'utiliser un modèle *in vivo*. L'espèce choisie est la souris, qui est la même espèce que pour le projet initial.

Pour ce projet, le nombre estimé d'animaux est de 100.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, ce protocole expérimental est établi avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale. Différents paramètres fonctionnels seront mesurés par les techniques non invasives pour évaluer la régénération tissulaire et vasculaire. Les études moléculaires se feront sur les prélèvements réalisés sur l'animal anesthésié.

11145 La pneumopathie à pneumocoque reste une des principales causes de mortalité dans le monde. Le recours à la respiration artificielle, appelée ventilation mécanique (VM), s'impose dans 20% des cas, avec une mortalité atteignant 50% malgré l'antibiothérapie. La VM génère des dommages pulmonaires qui facilitent la dissémination bactérienne. Aucune autre thérapie adjuvante n'a permis d'améliorer le devenir des patients présentant des pneumopathies graves. Dans le cadre de notre premier volet expérimental, nos travaux ont montré que la pneumonie et la VM favorisent une dysfonction des mitochondries, organelles vitales pour la survie de la cellule et l'intégrité du tissu, ce qui engendre une forte mortalité. L'injection de cellules souches mésenchymateuses stromales (CSMs) permet de corriger les dysfonctions mitochondriales et améliore la survie dans certains modèles d'infections.

Les objectifs de ce deuxième volet expérimental sont d'évaluer l'effet de l'injection intraveineuse de CSMs (issues de cordons ombilicaux humains), sur la fonction des mitochondries, l'élimination des bactéries et la survie des animaux souffrant de pneumonie et soumis à la respiration artificielle. Cet effet sera comparé à celui d'un antibiotique. L'association antibiothérapie et CSMs sera également évaluée.

Une attention particulière est portée à la règle des 3R :

Le Remplacement du modèle animal est limité pour ce type d'expérimentation. L'utilisation de modèles d'étirements de cellules pulmonaires ne permet pas de reproduire l'infection, la réponse immunitaire et les conséquences sur le reste de l'organisme qui conduisent au décès. Le lapin est un modèle privilégié pour une VM prolongée par les voies naturelles. La VM de plus petits animaux nécessite en effet des procédures invasives telles que la trachéotomie, ne peut être conduite plus de 6 heures, et se complique fréquemment.

Dans un objectif de Réduction, le nombre d'animaux choisi (7/groupe) est le nombre minimal déterminé par des études préliminaires pour permettre une analyse statistique intergroupes. Le nombre de lapins sera de 24 sur 6 mois (3 groupes de 7, +/- 3 lapins en cas de perte lors de l'anesthésie), permettant de comparer différentes conditions : CSMs seules, antibiothérapie, CSMs associées à l'antibiothérapie. Ces thérapies ne seront évaluées que dans le contexte de l'infection pulmonaire soumise à une VM jugée non protectrice, car produisant une pathologie grave, proche

de celle observée en réanimation et pour laquelle il est nécessaire de trouver de nouveaux traitements adjuvants à l'antibiothérapie.

Dans un objectif de Raffinement, chaque procédure (pose de cathéter, intubation, ventilation, inoculation, autopsie) sera réalisée sous anesthésie générale. Un cathéter veineux central maintenu par un gilet permet de s'affranchir de ponctions veineuses itératives et assure une anesthésie constante. Les animaux seront hébergés à température réglée puis sur tapis chauffant lors de la VM. Une mortalité de 100% est attendue dans les 24 premières heures sans traitement d'après nos résultats préliminaires mais les animaux resteront sous anesthésie générale, sans réveil, jusqu'au décès spontané, ou l'autopsie programmée à 24 heures. Un scope permettra de dépister les variations de fréquence cardiaque et une possible anomalie liée à l'anesthésie pour y remédier rapidement. Une évaluation rétrospective sera effectuée à la fin du projet.

11146 La mycose des poches gutturales est une affection se traduisant par le développement de champignons (*Aspergillus* sp. le plus souvent) dans la poche gutturale. L'inflammation locale peut avoir pour conséquence des signes neurologiques (paralysie laryngée, difficultés de déglutition.) en raison de la proximité de nombreux nerfs crâniens. Le développement des champignons peut également toucher les artères carotide interne et maxillaire qui passent juste contre la paroi de la poche gutturale, l'artère carotide interne (ACI) étant la plus fréquemment touchée. Suite à l'érosion de la paroi artérielle, le cheval peut présenter un saignement pouvant être fatal.

Lors de l'identification de cette pathologie, le traitement conventionnel est chirurgical et consiste à boucher l'artère atteinte pour que le sang ne puisse plus parvenir jusqu'à la brèche existant dans le vaisseau. Dans le cas de l'ACI, plusieurs techniques sont décrites, l'objectif étant de neutraliser le flux artériel au niveau de la brèche dans les deux sens. En effet, il existe un cercle artériel à la base du cerveau qui met en communication les artères carotides internes gauche et droite et l'artère basilaire. Le sang arrive donc dans l'artère en provenance du cœur (flux antérograde) mais aussi dans l'autre sens en provenance de ce cercle artériel (flux rétrograde). Pour boucher l'ACI, on peut mettre en place sous anesthésie générale un cathéter à ballonnet. Celui-ci est introduit dans l'ACI et avancé jusqu'à ce que son extrémité soit positionnée plus loin que la brèche existant (ou risquant de se produire) dans l'artère au niveau de la poche gutturale. Le gonflement du ballonnet situé à son extrémité permet de bloquer le flux sanguin rétrograde, tandis que le sang en provenance du cœur est bloqué par la ligature de l'ACI juste avant le point d'entrée du cathéter dans l'artère.

Une deuxième technique chirurgicale, développée plus récemment, consiste à boucher les artères atteintes avec de petits implants déposés sous contrôle angiographique et introduits par un cathéter mis en place dans l'artère carotide commune. Cette technique a été initialement développée avec le cheval sous anesthésie générale, et est maintenant réalisée dans quelques hôpitaux sur cheval debout, avec des contraintes majeures de radioprotection, ce qui limite son utilisation. Cette technique d'embolisation est de plus très coûteuse comparativement à la technique du cathéter à ballonnet.

Compte tenu d'une part des contraintes de radioprotection et du coût des implants utilisés pour cette deuxième technique, mais aussi des risques associés à l'anesthésie générale d'un cheval ayant déjà présenté un ou plusieurs épisode(s) hémorragique(s), l'idéal serait de pouvoir réaliser l'occlusion de l'ACI à l'aide d'un cathéter à ballonnet sur cheval debout. La ligature bilatérale de l'ACI est faisable dans notre expérience sur cheval debout, mais ne permet pas de neutraliser le flux sanguin résiduel provenant de l'artère basilaire, ce qui conserve un risque de saignement a posteriori.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la faisabilité de la mise en place d'un cathéter à ballonnet dans l'artère carotide interne sur cheval debout. L'intervention sera réalisée chez 4 chevaux adultes. Les sujets sont euthanasiés ultérieurement dans le cadre d'une autre procédure. Le cheval constitue l'espèce cible (remplacement impossible). L'utilisation de 4 chevaux permettra de réaliser 8 fois la procédure, ce qui paraît un nombre acceptable pour une étude de faisabilité technique. Un deuxième lot de 4 chevaux sera prévu si nécessaire en fonction des résultats obtenus sur le premier lot. A l'issue de la procédure, le cathéter à ballonnet sera retiré et une ligature de l'ACI sera réalisée. Les chevaux seront euthanasiés sous 7 jours. Ils seront examinés bi-quotidiennement en post-

opératoire afin de vérifier l'absence d'inflammation anormale au site chirurgicale ou de répercussions sur leur état général et recevront un traitement anti-inflammatoire et antibiotique classique en postopératoire.

11147 Notre projet a pour but d'étudier le rôle du transporteur de phosphate PIT1 dans les adipocytes au cours du diabète de type 2 et de l'Obésité. Pour cela, nous évaluerons l'homéostasie glucidique de souris transgéniques soumises à un régime obésogène et à un régime normal.

L'obésité est actuellement décrite comme l'épidémie mondiale du 21ème siècle et représente un problème majeur de santé publique. De nombreuses études démontrent que le phénotype du tissu adipeux est un des processus biologiques majoritairement perturbé ; ce phénomène contribue à la progression de l'obésité et à ses complications métaboliques et cardiovasculaires. Le tissu adipeux apparaît comme l'organe majeur responsable du développement de l'obésité et des complications. Il existe un besoin urgent de comprendre les mécanismes moléculaires dérégulés chez l'obèse et de les contrôler. Des études récentes démontrent que le transporteur membranaire PIT1 (Phosphate Inorganic Transporter 1) est impliqué dans la régulation de l'homéostasie glucidique. En effet, des souris invalidées spécifiquement pour Pit1 dans les hépatocytes améliorent la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline. Etant donné que le tissu adipeux et plus particulièrement les adipocytes, participe au contrôle de l'homéostasie glucidique, nous émettons l'hypothèse que les souris PIT-1 KO dans les adipocytes vont présenter une sensibilité accrue à l'insuline.

Pour valider notre hypothèse, nous utiliserons des souris transgéniques : invalidation du transporteur PIT1 dans les adipocytes. Ces souris seront soumises à un régime normal (contrôle) ou un régime gras pendant 1, 4, 8 et 12 semaines. Durant ce traitement obésogène ou non, l'homéostasie glucidique sera quantifié grâce à des tests métaboliques (test de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline). Afin d'avoir une caractérisation complète et statistiquement robuste, nous allons utiliser 20 souris par groupe soit 320 souris au total.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre de souris utilisées sera réduit au minimum : analyses de paramètres multiples pour chaque souris et utilisation de tests statistiques adaptés. Pour s'assurer du « bien être » des souris, elles bénéficieront de coton et de « maisons » en carton afin de les occuper et afin qu'elles puissent se construire un « nid ». Les souris seront sous surveillance journalière par le personnel de l'animalerie et 2 à 3 fois par semaine par les responsables du projet avec une évaluation de l'état général de l'animal, de la perte de poids, de l'apparence et du comportement de l'animal. Des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Les études *in vitro* comme les cultures cellulaires ne permettent pas d'obtenir un modèle physiologique d'obésité et d'homéostasie glucidique. Les modèles animaux sont donc nécessaires pour évaluer *in vivo* l'effet de l'invalidation de PIT1 sur les adipocytes, mais également pour définir la réponse globale d'un animal à une situation physiopathologique lorsque PIT1 est invalidé dans les adipocytes.

A terme, les résultats de ce projet permettront d'identifier des mécanismes moléculaires impliqués dans le diabète de type 2 et l'obésité et plus particulièrement le rôle du transporteur PIT1.

11148 De nombreuses maladies neurologiques telles que la maladie de Parkinson, la fibromyalgie ou le syndrome des jambes sans repos sont associées à des altérations des niveaux de dopamine. Certains symptômes résulteraient en partie d'un dysfonctionnement des circuits neuronaux contrôlés par la dopamine au niveau de la moelle épinière.

Ce projet a pour objectif de caractériser les neurones cibles de la dopamine (c'est à dire exprimant les récepteurs dopaminergiques) dans la moelle épinière et de préciser le rôle fonctionnel de ces récepteurs dans le contrôle des fonctions motrices et sensorielles.

La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de différentes lignées de souris génétiquement modifiées permettant 1) l'identification cellulaire, moléculaire et électrophysiologique des neurones exprimant les récepteurs cibles de la dopamine et de 2) déterminer leur rôle fonctionnel dans la moelle épinière.

La règle des 3R sera appliquée de la façon suivante.

Réduire :

Cette étude anatomo-fonctionnelle s'articulera autour de 3 objectifs qui impliqueront 5 procédures expérimentales (classes légères à modérées).

Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude est de 362 sur une période de 3 ans. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité statistique des expériences qui seront menées. Seules les expériences considérées comme absolument indispensables seront réalisées. Dans le but d'une exploitation maximale des données obtenues, outre les moelles épinières tous les cerveaux des animaux utilisés seront prélevés pour des analyses histochimiques.

Raffiner :

Toutes les souris seront utilisées de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales. Les animaux seront hébergés en groupe dans des environnements enrichis (nids végétaux.). Afin de diminuer le stress, les souris seront manipulées quotidiennement par les expérimentateurs avant chaque procédure expérimentale. Ce projet implique de la neurochirurgie qui sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance sont détectés.

Remplacer :

Le projet reposant sur l'établissement de liens de causalité entre l'identité moléculaire et cellulaire des neurones dopaminocéptifs et le contrôle des fonctions motrices et somesthésiques, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par des méthodes alternatives.

11149 La dissection sous muqueuse endoscopique (Endoscopic submucosal dissection ou ESD) permet le traitement des cancers superficiels de l'œsophage en évitant le geste chirurgical lourd que représente la résection complète de l'œsophage. Cependant, le développement de cette technique se heurte à une cicatrisation anormale de l'œsophage qui a tendance à se rétrécir. Le rétrécissement -ou sténose de l'œsophage- empêche le patient de s'alimenter normalement et nécessite des interventions endoscopiques répétées pour dilater l'œsophage. La formation de la sténose cicatricielle est liée à l'exposition de la zone opérée au contenu de l'œsophage (aliments, reflux acide, bactéries et champignons). Actuellement, le traitement de référence pour prévenir la sténose œsophagienne après traitement endoscopique est la corticothérapie, administrée oralement ou appliquée dans l'œsophage par des injections endoscopiques. Un gel contenant un peptide auto-assemblé (self assembling peptide ou SAP), se solidifiant au contact des tissus, a reçu un marquage CE pour arrêter les saignements sur les plaies opératoires, et des études préliminaires ont suggéré son intérêt dans la prévention de la sténose œsophagienne après traitement endoscopique. En effet, ce gel adhère à la plaie opératoire plusieurs jours avant d'être détruit et éliminé par l'organisme, permettant ainsi aux processus de coagulation et de cicatrisation de débiter. Ce gel, en protégeant la plaie de l'œsophage après l'intervention endoscopique, pourrait induire une cicatrisation harmonieuse de l'œsophage. Nous souhaitons évaluer la capacité du gel appliqué sur la plaie œsophagienne consécutive à une dissection sous muqueuse endoscopique, à prévenir la formation d'une sténose œsophagienne cicatricielle.

Le modèle porcin est un excellent modèle du fait de ses dimensions voisines de celles de l'Homme permettant d'utiliser le même type de matériel endoscopique. En outre, les phénomènes étudiés étant liés à la cicatrisation de l'œsophage, ils sont dynamiques et requièrent l'utilisation d'animaux vivants. L'étude *in vitro* de ces phénomènes n'est pas envisageable compte tenu de la multiplicité des types cellulaires qui entrent en jeu dans la cicatrisation.

Pour ce faire, nous avons prévu une étude comparative entre les animaux traités par ESD seule, ceux traités par ESD suivie de l'application du gel, et ceux traités par ESD suivie de l'application du gel associé à un corticoïde local. Cette étude nécessitera 38 porcs supplémentaires, objet de

l'amendement. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum au moyen d'un calcul d'effectif d'une part, et d'autre part d'une étude de faisabilité préliminaire.

Afin de préserver le bien-être des animaux, le protocole expérimental a été raffiné, en minimisant la durée de l'étude, en définissant des points limites, et en réalisant toutes les procédures sous anesthésie générale et antalgiques. L'effet des différents traitements sera évalué par contrôle endoscopique afin d'étudier le taux de sténose œsophagienne à 14 jours et à 28 jours. Cette étude animale permettra de définir les risques de sténose œsophagienne et leur prévention avant son application clinique chez l'homme.

11150 Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) représentent aujourd'hui un problème de santé publique majeur dont l'incidence ne cesse de croître dans les pays européens et nord-américains. Plusieurs facteurs aggravants ont été identifiés tels que l'altération du microbiote intestinal, certains régimes ou additifs alimentaires, des polluants environnementaux ou encore des souches bactériennes pathogènes. Parallèlement, des bactéries bénéfiques ont aussi été identifiées, bien qu'à ce jour aucune thérapie curative n'ait été développée. De plus, l'immense complexité de l'environnement intestinal de l'Homme représente un réel obstacle quant à la découverte des mécanismes aggravants ou protecteurs impliqués dans ces pathologies.

C'est pourquoi, à l'aide d'une approche novatrice, ce projet vise à mieux caractériser les interactions entre l'hôte, le microbiote et les facteurs aggravants/bénéfiques impliqués dans ces pathologies inflammatoires chroniques intestinales. A plus long terme, ce travail permettra d'identifier de nouvelles approches thérapeutiques afin d'améliorer la qualité de vie et le pronostic des patients atteints de MICI en ciblant spécifiquement le microbiote intestinal. L'approche envisagée repose sur l'utilisation d'un modèle murin possédant un microbiote intestinal simplifié, contrôlé et sain. Ces animaux seront soit 1) soumis à des polluants environnementaux, 2) infectés par des bactéries pathogènes, 3) colonisés par des souches potentiellement probiotiques ou 4) soumis à différents types d'alimentation. Ces animaux ont déjà permis une meilleure compréhension des mécanismes d'infection et de résistance mettant en jeu des pathogènes humains et ne seront soumis à aucun prélèvement invasif.

Pour des raisons éthiques, cette étude ne peut se faire chez l'Homme et il n'existe, à ce jour, aucune méthode d'expérimentation *in vitro* alternative pour étudier les mécanismes mis en jeu dans les MICI.

Afin de minimiser au mieux le nombre d'animaux impliqués dans ce projet, le regroupement de ces quatre procédures permettra une diminution du nombre d'animaux par groupe expérimental, une mutualisation maximale des échantillons, ainsi qu'une fiabilité optimale des résultats. De plus, afin d'optimiser l'utilisation de chaque animal, un maximum d'échantillon sera prélevé puis analysé. Enfin, le nombre total d'animaux nécessaire a été réduit dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet et est estimé à 480.

Ainsi, l'objectif 1) prévoit l'étude de l'impact des polluants environnementaux sur l'environnement intestinal impliqué dans les MICI grâce à l'utilisation de 96 animaux. L'objectif 2) vise à étudier le rôle de l'infection bactérienne sur le déclenchement et le maintien de l'inflammation intestinale et prévoit l'utilisation de 96 animaux. L'objectif 3) vise à l'identification de bactéries protectrices envers les MICI et prévoit l'utilisation de 96 animaux. Enfin, l'objectif 4) prévoit l'étude du microbiote soumis à un régime alimentaire associé au déclenchement et à l'évolution des MICI, en présence ou non de polluants environnementaux et de bactéries pathogènes ou bénéfiques. Nombre d'animaux estimés à 192. Ce projet a été dessiné sur 5 ans.

Quel que soit le groupe expérimental, les animaux seront suivis au cours du temps, hébergés dans des cages enrichies et dont la litière sera changée de manière hebdomadaire. Une observation quotidienne sera réalisée et les animaux seront immédiatement sortis du protocole s'ils présentent deux des critères suivant : une perte de poids supérieure à 20% ; un dos voûté, un poil dru ou une démarche traduisant un mal-être ; du sang dans les fèces ou de la diarrhée.

11151 Un cathéter veineux central (CVC) est un tube mince et flexible, introduit dans une veine de la base du cou (jugulaire) ou du thorax (sous-Clavière) jusqu'à atteindre la veine cave supérieure au niveau du cœur.

Ce dispositif, couramment mis en place chez l'homme en clinique, peut permettre l'injection de traitements par voie intraveineuse (IV), la perfusion de sang ou de plaquettes, le prélèvement d'échantillons sanguins ou encore la mise en place d'une nutrition parentérale (injection d'éléments nutritifs par voie IV).

La mise en place d'un CVC apporte plusieurs avantages :

- réduction du nombre de piqûres d'aiguille pour injections ou prélèvements ;
- atténuation de l'endolorissement/sensation de brûlure parfois causés par un traitement IV administré par une perfusion standard périphérique ;
- accroissement du confort et réduction de l'anxiété chez les personnes nécessitant un traitement IV ou des prélèvements sanguins à répétition.

Le but de ce projet est d'apporter les mêmes avantages à notre modèle animal qu'est le lapin dans le cadre de prestations ou collaborations avec d'autres chercheurs. Cinquante lapins cathétérisés sont prévus pour l'année 2019.

Une attention particulière sera portée à la règle des 3R :

Différents types d'étude seront réalisés chez les lapins cathétérisés : analyse pharmacocinétique d'un nouveau composé, tests de toxicité ou évaluation de l'efficacité de nouvelles thérapies. L'ensemble de ces utilisations met en jeu l'organisme dans son entièreté et rend le remplacement du modèle animal difficile.

Dans un objectif de Réduction, le nombre d'animaux choisis (50 lapins) correspond au minimum qui nous est habituellement commandé sur une année. De plus la mise en place d'un cathéter permet d'augmenter le nombre de prélèvements possibles sur un même animal en minimisant sa douleur. Il permet donc de réduire le nombre d'animaux normalement nécessaires à un échantillonnage important.

Dans un objectif de Raffinement, la procédure de pose de cathéter est réalisée sous anesthésie générale par du personnel qualifié. Le design du gilet (forme, choix du matériau etc.) utilisé pour le maintien du cathéter permet la libre circulation de l'animal dans sa cage sans risque d'arrachement. Les conditions d'hébergement sont également optimisées par l'enrichissement du milieu. Enfin, l'utilisation de l'analgésique buprénorphine ainsi qu'un suivi et repos de 24h post-opératoire sont mis en place pour réduire la douleur et s'assurer qu'aucune gêne liée au cathéter et au gilet n'est ressentie par l'animal après l'opération.

Dans le cas où un lapin montrerait des signes de douleurs non résolus par l'antalgique, il serait euthanasié.

11152 Les virus Usutu (USUV) et West Nile (WNV) sont des arbovirus (transmission par des moustiques de type Culex), présents aussi chez certains oiseaux (tels que les merles ou les corbeaux) constituant leurs réservoirs. Ces virus sont très proches phylogénétiquement. L'USUV n'est, pour l'heure, pas impliqué dans des épidémies chez l'Homme, mais des cas sporadiques ont été rapportés en Afrique et plus récemment en Europe (dont un cas en France), incitant à la prudence concernant l'émergence de ce virus chez l'Homme. Le WNV circule également en Europe, notamment en 2018 où plus de 1500 cas humains ont été répertoriés dont plus de 20 en France. Les manifestations cliniques de ces deux virus chez l'homme peuvent aller de simples symptômes pseudo-grippaux à des atteintes neurologiques de type méningites ou encéphalites.

Notre équipe a obtenu des résultats intéressants sur le potentiel neurotropique de ces deux virus émergents en utilisant des cultures *in vitro* de cellules neuronales (cellules souches neuronales, neurones moteurs, astrocytes). Il reste maintenant notamment à confirmer ces résultats sur des modèles *in vivo*, indispensables pour valider nos observations afin notamment de mettre en évidence un éventuel transport axonal de ces virus ainsi que d'étudier leur rôle dans le déclenchement d'un processus inflammatoire et dans la dégénérescence axonale associés à

certains cas cliniques. L'objectif principal de notre travail est de mieux comprendre le neurotropisme de ces deux virus et les voies d'accès au système nerveux central. Notre projet doit inclure 280 animaux. Les animaux seront manipulés en confinement A3 en respectant les règles en vigueur dans l'animalerie d'accueil (portoirs ventilés suivant les manipulations effectuées, traitement de la litière comme déchets infectieux, formation du personnel manipulant les animaux ...).

Afin de correspondre à la règle des 3R nous mettrons en place les procédures suivantes :

1. Réduction

- Les données seront analysées par un biostatisticien afin de minimiser le nombre d'animaux.

Par ailleurs les mêmes animaux seront utilisés pour effectuer à la fois les analyses histochimiques et biochimiques.

Les expériences d'injections et le sacrifice des animaux seront toujours effectuées par le même utilisateur afin de limiter la variabilité expérimentale et minimiser le nombre d'animaux utilisés. Les moelles épinières et nerfs sciatiques disséqués pourront aussi être observés en IRM de diffusion *ex vivo* afin d'évaluer le degré de démyélinisation.

2. Remplacement

Une partie du projet sur modèles cellulaires (astrocytes, neurones moteurs, cellules souches neuronales, microglie) dans le but d'effectuer une première identification des gènes potentiellement impliqués dans le neurotropisme et l'inflammation initiée par ZIKV et USUV. Ces gènes candidats seront étudiés en priorité sur nos animaux. Le transport axonal sera également étudié *in vitro* en utilisant des chambres microfluidiques permettant de compartimentaliser le corps cellulaire du neurone de son axone.

3. Raffinement

- La procédure la plus douloureuse de ce projet est l'injection dans le nerf sciatique des virus WNV et USUV. Elle sera effectuée sous anesthésie à l'isoflurane 2.5%.

Les opérations seront réalisées le matin afin de surveiller le réveil et l'état des animaux jusqu'au début de soirée. L'évaluation clinique de chaque souris sera réalisée par le responsable tout au long de l'expérience.

-Le palier de douleur prévisible à une injection dans le nerf sciatique est de degré 2 (modéré) car les douleurs postopératoires sont estimées d'intensité moyenne sur une période courte. Nous utiliserons comme analgésique la buprénorphine à la dose de 0,1 mg/kg en sous cutanée. La buprénorphine devrait agir environ 6h, avec une première injection le matin lors de l'acte chirurgical, permettant ainsi de refaire une injection le soir s'il y a manifestation de douleur.

Tout animal présentant des signes de morbidité sera exclu de l'expérience et immédiatement euthanasié par injection létale de pentobarbital avant la fin de l'expérience. Afin de déterminer le point limite de notre expérience aboutissant au sacrifice de nos animaux nous nous baserons sur un ensemble d'observations pour l'évaluation de la souffrance, de la détresse et de l'inconfort des animaux de laboratoire, en se basant sur l'évaluation de 4 aspects de l'état d'un animal :

1. Variation du poids de l'animal (et variations connexes au niveau de l'ingestion de nourriture et d'eau). Tous les animaux subissant une perte de poids de plus de 20% seront sacrifiés. Notre étude s'effectuant sur le court terme, il ne devrait pas y avoir de perte de poids conséquente chez nos animaux.

2. Apparence physique externe. Incluant notamment l'aspect du poil des animaux.

3. Signes cliniques mesurables. Exemples : changements du rythme cardiaque, du rythme respiratoire et de la nature de ceux-ci.

11153 L'épithélium rénal assure des fonctions cruciales qui permettent de filtrer le sang afin d'éliminer les déchets de l'organisme dans les urines. La filtration rénale dépend de l'intégrité de cellules épithéliales du glomérule rénal nommées podocytes. Ces cellules hautement spécialisées sont lésées chez 90% des patients souffrant de maladies rénales chroniques et leur incapacité à se régénérer conduit à terme au développement d'insuffisance rénale terminale.

Les podocytes sont décrits comme des cellules incapables de proliférer et ayant une capacité de régénération très limitée suite à une lésion ou en conditions homéostatiques. Cependant, des résultats récents montrent que la modulation de l'expression d'une protéine nommée pT dans le rein de souris adulte induit une régénération efficace des podocytes. Ces résultats montrent que les podocytes possèdent une capacité de régénération latente, un potentiel révélé par l'activation d'une voie de signalisation faisant intervenir la protéine pT.

Du fait du contrôle temporel de la régénération des podocytes, le modèle de souris génétiquement modifiées permettant la modulation de pT fournit un outil de choix pour comprendre comment la régénération des podocytes est assurée dans l'organisme adulte. Aussi, nous utilisons ce modèle afin d'élucider les mécanismes cellulaires permettant une régénération efficace des podocytes dans l'organisme adulte. Des résultats préliminaires publiés montrant que la protéine pT est impliquée dans la régulation de la voie de signalisation Wnt dans d'autres organes, nous émettons l'hypothèse que les cellules stimulées par pT, qui vont permettre la régénération efficace des podocytes, vont activer la voie Wnt au cours de ce processus. Aussi, nous souhaitons tracer les cellules exprimant Lgr5, une cible de la voie de signalisation Wnt, au cours de la régénération des podocytes forcée par pT. La complétion du projet présenté ici permettra d'éclaircir les mécanismes responsables du renouvellement de l'épithélium rénal, et fournira de ce fait des connaissances cruciales pour le développement de stratégies thérapeutiques permettant de traiter les patients atteints de maladies rénales.

Dans notre modèle souris, la prolifération de l'épithélium rénal liée à la modulation de pT, résulte en une baisse de l'efficacité de la barrière de filtration glomérulaire et donc en un dysfonctionnement rénal qui peut avoir des conséquences sur l'état de santé général de la souris. Aussi, pour limiter l'impact de nos expérimentations sur le bien-être des animaux, nous avons mis en place un suivi strict et régulier de la douleur et du stress potentiellement engendrés par les procédures expérimentales grâce à l'utilisation de grilles de scores (Raffinement).

Pour réaliser ce projet sur 3 ans, nous utiliserons un maximum de 130 animaux. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement robustes à partir du nombre minimum d'animaux (Réduction). Sur ces animaux, nous prélèverons également d'autres organes qui pourront servir ultérieurement à d'autres projets scientifiques (Réduction).

Suite à ce projet, des analyses mécanistiques *in vitro* sur des cellules en culture seront mises en place (Remplacement). Cependant, l'étude de la régénération de l'épithélium rénal ne peut pas être réalisée, par définition, sur des cellules en culture, c'est pour cela qu'il est essentiel de réaliser des expérimentations sur les souris.

11154 L'angioplastie coronaire est une méthode de revascularisation myocardique. Le cœur est un muscle nourri par des artères : les artères coronaires. Si une ou plusieurs de ces artères coronaires sont obstruées, il est important de les déboucher. L'angioplastie coronaire consiste à mettre en place aux endroits rétrécis un ballonnet coulissant sur un guide métallique. Ce ballonnet est gonflé pour dilater l'artère puis dégonflé et retiré. Dans certains cas, une prothèse (stent) peut-être mise en place. La prothèse est un grillage métallique qui est plaqué sur la paroi de l'artère et laissé en place à demeure. Cette technique jusqu'ici totalement « manuelle » était réalisée sous contrôle radiographique et exposait les cardiologues et les patients à de fortes radiations. Dans ce cadre un robot dédié à la cathétérisation a été développé. Il est piloté à distance et permet un geste plus précis, des temps opératoires plus courts et donc des expositions aux radiations moins longues. L'efficacité de ce robot a été testée et approuvée dans un modèle porcin. Suite à la validation de son utilisation en clinique, de nombreux centres hospitaliers souhaitent s'en équiper. L'utilisation de ce robot nécessite la mise en œuvre d'une phase de formation *in vivo*. Pour cela le modèle animal recommandé est le porc dans la mesure où son anatomie coronarienne est proche de l'anatomie humaine.

Dans le cadre de la règle des 3Rs :

Raffiner : la formation *in vivo* ne sera réalisée qu'après une phase de formation théorique et *in vitro* à l'utilisation du dispositif Médical. Les porcs seront prémédiqués de façon appropriée et l'ensemble des gestes chirurgicaux seront réalisés sous anesthésie générale monitorée avec analgésie adaptée. La procédure sera sans réveil avec mise à mort par surdose d'anesthésie (confirmé par le monitoring : ECG plat). Les porcs arriveront 7 jours avant l'intervention et seront hébergés en enclos intérieur sur caillebotis plastiques, leur espace de vie sera enrichie par des jouets dédiés type balles à bruit et disque à mordre. L'ensemble de la formation sera supervisé par un référent expert en cathétérisme sur le modèle porcin ainsi que par une infirmière anesthésiste.

Réduire : la formation sera effectuée sur 5 porcs sur 5 jours et permettra de former 3 cardiologues par jours soit 15 cardiologues.

Remplacer : La formation débutera par une prise en mains du robot sur un cœur artificiel.

La formation des chirurgiens à l'utilisation de ce robot est essentielle pour l'avenir des patients souffrant de coronaropathie.

11155 Le botulisme animal, notamment le botulisme aviaire est une pathologie due à l'action de la toxine botulique produite par *Clostridium botulinum* et ré-émergente au niveau mondial depuis une dizaine d'années. Cette pathologie est encore méconnue et, de ce fait, délicate à gérer. Le botulisme aviaire est dû à la production *in situ* de la toxine botulique par le pathogène puis à la ré-ingestion de la toxine par l'animal via coprophagie.

Disposer d'un modèle infectieux de botulisme aviaire permettrait :

- D'étudier la pathogénie du botulisme aviaire et, notamment, de mieux comprendre les mécanismes impliqués ;
- D'identifier les organes et les zones des tissus contaminés par la bactérie et le rôle de cette contamination des tissus par la bactérie dans la maladie ;
- De comparer la pathogénicité des souches et des types toxiques ;
- D'explorer les aspects épidémiologiques (identification des sources de contamination, modalités de transmission entre individus) ;
- De tester et proposer des mesures appropriées pour la gestion des épisodes de botulisme aviaire.

Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la reproduction expérimentale du botulisme aviaire (4 études dont 3 publiées dans les années 70). Sur la base des résultats présentés dans ces articles, l'objectif est de développer un modèle expérimental de botulisme aviaire et de déterminer les conditions expérimentales requises pour permettre la reproduction des symptômes de botulisme.

L'utilisation d'un modèle animal pour ce projet est nécessaire et ne peut être remplacée par des expériences *in vitro* car il n'est pas possible de reproduire les symptômes de la maladie ou de déterminer les conditions expérimentales permettant de reproduire ces symptômes à partir d'essais *in vitro*. Cependant, le nombre d'animaux utilisés sera réduit autant que possible. Les tests statistiques basés sur les 4 études actuellement disponibles montrent que des lots de 10 animaux sont suffisants pour obtenir les résultats attendus : 60 poulets seront ainsi utilisés pour notre projet. Les animaux seront élevés au sol sur litière. La procédure expérimentale consiste à tester deux doses de spores (une dose forte et une dose faible (dose forte diluée au 1/100) avec traitement antérieur des animaux par un antibiotique visant les bactéries Gram- ou absence d'antibiotique. La colonisation du tractus digestif des animaux par la souche de *C. botulinum* (prérequis à l'apparition des symptômes d'après les articles disponibles dans la littérature) sera suivie via l'utilisation d'écouvillons cloacaux (méthode non invasive). Les organes (foie, rate, gésier, intestin, caeca) seront prélevés 14 jours après inoculation afin de suivre la dissémination éventuelle du pathogène dans les organes ou suite à la mise à mort des animaux du fait de l'atteinte du point critique (dès apparition des premiers signes de paralysie des animaux). L'analyse des organes permettra de suivre la contamination par *C. botulinum*.

11156 L'épithélium rénal assure des fonctions cruciales qui permettent de filtrer le sang afin d'éliminer les déchets de l'organisme dans les urines. La filtration rénale dépend de l'intégrité de cellules épithéliales du glomérule rénal nommées podocytes. Ces cellules hautement spécialisées sont lésées chez 90% des patients souffrant de maladies rénales chroniques et leur incapacité à se régénérer conduit à terme au développement d'insuffisance rénale terminale.

Les podocytes sont décrits comme des cellules incapables de proliférer et ayant une capacité de régénération très limitée suite à une blessure ou en conditions homéostatiques. Cependant, des résultats récents montrent que la modulation de l'expression d'une protéine nommée pT dans le rein de souris adulte induit une régénération efficace des podocytes. Cette régénération des podocytes induite par pT est la conséquence de l'activation de cellules souches situées dans le rein adulte. Ces résultats montrent que les podocytes possèdent une capacité de régénération latente, un potentiel révélé par l'activation d'une voie de signalisation faisant intervenir la protéine pT.

En plus de cette régénération forcée observée dans le modèle de souris transgéniques permettant de moduler pT dans l'organisme adulte, des résultats de l'équipe montrent que les podocytes sont également capables de se régénérer naturellement suite à une blessure. De plus, les cellules souches du rein activées lors de cette régénération naturelle surexpriment pT. L'objectif de ce projet est de déterminer si pT est nécessaire à la régénération naturelle des podocytes observée suite à une blessure. Pour répondre à cette question, nous allons utiliser des souris génétiquement modifiées permettant d'invalider pT. Nous allons alors déterminer quel est l'impact de l'invalidation de pT sur le processus de régénération naturelle des podocytes. La complétion du projet présenté ici permettra d'éclaircir les mécanismes impliqués dans la régénération du rein, et fournira de ce fait des connaissances cruciales pour le développement de stratégies thérapeutiques permettant de traiter les patients atteints de maladies rénales.

Dans notre étude, nous allons utiliser un modèle de régénération naturelle suite à une blessure. La blessure, réalisée par injection d'une toxine, peut conduire au développement d'un phénotype dommageable. En effet, suite à l'injection de toxine, les souris présentent une élévation du taux de protéinurie reflétant une dysfonction de la filtration rénale dès 5 jours après l'injection. Cependant, cette blessure est réversible, et 90% des animaux récupèrent une fonction rénale normale 40 jours après l'injection. Toutefois, la réalisation de cette blessure sur des animaux invalidés pour pT peut aboutir au développement d'une insuffisance rénale chronique, et l'évolution de la pathologie rénale suite à l'injection de la toxine doit donc être surveillée étroitement. Aussi, pour limiter l'impact de nos expérimentations sur le bien-être des animaux, nous avons mis en place un suivi strict et régulier de la douleur et du stress potentiellement engendrés par les procédures expérimentales grâce à l'utilisation de grilles de scores (Raffinement).

Pour réaliser ce projet sur 2 ans, nous utiliserons un maximum de 120 animaux. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement robustes à partir du nombre minimum d'animaux (Réduction).

Suite à ce projet, des analyses *in vitro* sur des cellules en culture portant sur les mécanismes moléculaires régulant la régénération seront envisagées (Remplacement). Cependant, l'élucidation des mécanismes cellulaires régulant la régénération du rein ne peut pas être réalisée à l'heure actuelle sur des cultures cellulaires, et c'est pour cela qu'il est essentiel de réaliser des expérimentations sur les souris.

11157 La mitochondrie est une organelle intracellulaire incontournable en ce qui concerne le métabolisme et la production d'énergie. Une mauvaise régulation ou un déficit de ces fonctions entraînent des maladies rares incurables caractérisées par des défaillances énergétiques sévères au niveau des tissus ayant de fortes demandes énergétiques tels que le cerveau, le foie, le cœur ou les muscles. Par ailleurs, les dysfonctions énergétiques mitochondriales sont également retrouvées dans des pathologies communes comme le diabète ou le cancer. Il n'existe à l'heure actuelle aucune solution thérapeutique pour ces maladies mitochondriales.

Récemment, il a été mis en évidence que la voie cellulaire dite « ubiquitine/protéasome » peut contrôler la production d'énergie par la mitochondrie. Notre projet se place dans ce cadre. Il s'agit

de démontrer que nous pouvons moduler la production d'énergie et le métabolisme mitochondrial dans les tissus en contrôlant cette voie ubiquitine/protéasome. Pour cela, nous allons nous appuyer sur l'utilisation d'une souris transgénique déficiente pour une enzyme de la voie ubiquitine, mimant ainsi les effets d'un dysfonctionnement de cette voie sur les fonctions énergétiques mitochondriales dans différents tissus. Ces effets tissulaires et leurs conséquences pour l'organisme ne peuvent pas être évalués sur des modèles *in vitro*. Ces études permettront d'identifier les éléments clés responsables de déficiences mitochondriales et comprendre comment nous pouvons corriger ces déficits en contrôlant ces éléments clés. Ainsi, ce projet permettra d'établir les bases pour un traitement des maladies mitochondriales et de certaines pathologies associées à des déficiences métaboliques.

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences 264 animaux. Dans le respect de la règle des 3R, nous combinerons nos lots témoins dans le but de réduire le nombre d'animaux et différents tissus seront analysés sur un même animal. De même, les analyses tissulaires de production d'énergie seront effectuées sur les animaux soumis aux tests phénotypiques. L'utilisation de cellules en cultures permettra de remplacer les animaux pour l'étude de certains mécanismes moléculaires. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leurs naissances à leurs morts. Chaque cage reçoit un enrichissement permettant un bon raffinement des conditions d'hébergement.

11158 But du protocole expérimental : Production d'anticorps sur lapin néozélandais femelle après injection d'antigène avec rappel chaque mois. Le choix de l'animal s'est fait car le lapin est un très bon modèle pour ce type de protocole, ce qui permet d'optimiser au mieux la production et d'utiliser un nombre réduit d'animaux. Cette méthode appliquée au lapin est une méthode validée, qui permet de satisfaire aux besoins avec l'utilisation du nombre le moins élevé d'animaux possibles, il n'y a pas de méthode substitutive. Un prélèvement de sang deux fois par mois permet de récupérer les anticorps concernés, un nombre de lapin adapté, pour des prélèvements légers, tous les quinze jours, environ 1300 lapins sur 5 ans. La durée d'un protocole est de 18 mois, à la fin de ces protocoles les animaux, en fin de vie, sont euthanasiés. La durée de la phase de prélèvement est basée sur le temps pendant lequel la quantité d'anticorps récupérés est satisfaisante. Les lapins sont confinés dans des pièces d'unité animale qui leur sont dédiés, en ne dépassant pas le nombre d'animaux recommandé, correspondant aux surfaces disponibles et au renouvellement d'air. Les lapins proviennent de la partie élevage de laboratoire du même établissement, limitant les risques sanitaires et les stress de transport. Le rôle des personnels impliqués, dans le cas de ces protocoles : expérimentateur, vétérinaire, animalier et responsable de l'état sanitaire des animaux, est bien défini, un contrôle plus important après chaque manipulation est également défini pour les personnes directement concernées. Les douleurs pendant le prélèvement et l'injection de rappel de l'antigène sont des douleurs moyennes.

11159 L'état de stress post-traumatique (PTSD) est une pathologie qui se caractérise par l'apparition de symptômes anxieux chez un individu victime ou témoin d'un événement traumatisant sévère. Parmi les facteurs qui peuvent prédisposer au PTSD, la composante génétique est importante, en particulier pour les gènes qui codent le système sérotoninergique impliqué dans la régulation des émotions et le traitement de la dépression. Parmi ces gènes, celui qui code le récepteur sérotoninergique 5-HT_{2C} semble avoir une importance particulière puisque les souris dont ce gène est modifié (souris appelées VGV) sont d'une part très anxieuse et montrent d'autre part des réponses anormales à la peur. Ainsi nous faisons l'hypothèse que ces souris pourraient être un bon modèle du PTSD. Il n'existe pas actuellement de modèles spontanés de PTSD et ceux-ci sont indispensables au développement d'un traitement efficace, aujourd'hui absent.

Pour pouvoir développer des stratégies thérapeutiques innovantes, il faut d'abord comprendre les mécanismes cérébraux de la maladie. Ce projet ayant pour but d'étudier des phénomènes comportementaux et des processus biochimiques, les méthodes alternatives actuelles sont insuffisantes. Les modifications cérébrales et comportementales complexes étudiées s'inscrivent dans le cadre d'une étude intégrée et doivent donc être réalisées chez des animaux.

Pour cela, nous étudierons ce modèle pathologique basé sur des altérations de la gestion de la peur, chez la souris de laboratoire adulte de la lignée C57BL6J âgée de 12 semaines (288 souris sur 2 ans). Ce modèle permet l'étude des comportements et des mécanismes qui sous-tendent la maladie et l'évaluation du potentiel thérapeutique de nouveaux médicaments.

Les souris VGV seront exposées à une expérience stressante. Nous mesurerons leur anxiété et leur comportement de peur, et les comparerons avec ceux des souris contrôles de la lignée C57BL6J. Une partie des souris sera également traitée par une molécule en développement en comparaison avec un antidépresseur connu, afin d'évaluer l'efficacité potentielle de ce nouveau traitement dans la prise en charge du PTSD. Les cerveaux de ces souris seront finalement prélevés afin d'effectuer des analyses neurochimiques et de déterminer des biomarqueurs de susceptibilité à la maladie.

Les analyses comportementales seront effectuées à l'aide de matériels et de logiciels dédiés qui permettent d'automatiser les procédures et d'avoir une meilleure reproductibilité des données et de diminuer le nombre de souris requis. Les analyses neurochimiques seront réalisées chez les souris dont le comportement a été analysé, afin de ne pas augmenter le nombre d'animaux.

Les souris seront observées quotidiennement. Une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur ou de souffrance chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

Au terme de ce projet nous espérons déterminer les altérations biochimiques qui induisent une mauvaise gestion de la mémoire traumatique afin de mieux prendre en charge les patients atteints de PTSD.

11160 Environ 15 % des salariés français sont concernés par le travail de nuit, dont l'impact sur la santé (troubles du sommeil et du métabolisme, risques de cancer ou de troubles cardiovasculaires et psychiques) a été reconnu par l'agence nationale de sécurité sanitaire (2016). L'accompagnement et la prise en charge des personnes concernées impliquent une meilleure connaissance de l'horloge biologique interne qui règle notre physiologie en harmonie avec le cycle normal des jours et des nuits, sur une période de 24 heures. Cette horloge, mise à mal dans le cadre du travail en horaires décalés ou chez les personnes voyageant fréquemment au travers des fuseaux horaires, est localisée dans une petite structure de notre cerveau profond : les noyaux suprachiasmatiques (NSC). Alors que les bases moléculaires de cette horloge sont maintenant bien connues, le fonctionnement des neurones des NSC, leur participation dans des réseaux neuronaux, et leur intégration dans la complexité de l'organisme restent des éléments essentiels mais incompris. C'est pourquoi nous proposons d'étudier la vie des neurones des NSC directement dans le cerveau de souris vigiles et libres de leurs mouvements, grâce à un tout nouveau microscope "portatif" adapté aux petits rongeurs.

Notre démarche expérimentale s'appuie sur une réflexion garantissant la mise en application dans le respect de la règle des 3Rs de la façon suivante :

- Remplacement : Par définition, l'étude de physiologie intégrée que nous proposons n'est pas réalisable par des approches de remplacement comme les cultures cellulaires ou tissulaires qui ont déjà été largement utilisées dans ce domaine de recherche. Cette étape d'expérimentation animale est donc indispensable. En revanche, ce projet va apporter de nouvelles informations sur le fonctionnement des NSC *in vivo*, et les données uniques que nous obtiendrons serviront au perfectionnement d'un modèle mathématique de l'horloge des Mammifères, élaboré dans notre équipe et qui permettra ensuite des simulations expérimentales sans recours à l'animal.

- Raffinement : Notre approche *in vivo*, bien que plus difficile techniquement et relativement invasive, permet un accès aux phénomènes biologiques tels qu'ils se passent dans l'animal non-anesthésié et non-contraint. Nous apporterons tout le soin nécessaire pour garantir une qualité irréprochable des données enregistrées, notamment en réalisant l'ensemble des manipulations invasives en une seule chirurgie, et en donnant aux animaux le temps de s'acclimater aux conditions d'enregistrement.

- Réduction : Un atout majeur de l'approche envisagée ici est de permettre un suivi longitudinal sur plusieurs jours dans lequel chaque souris est son propre contrôle, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés. 8 groupes de 15 souris seront constitués, soit un total de 120 animaux impliqués dans les procédures expérimentales.

11161 Dans la nature, les souris mâles adultes ont un comportement social parfois agressif. Ce comportement d'agression est impliqué dans la compétition pour les ressources, pour les partenaires sexuels, pour l'établissement de relations hiérarchiques de domination et de subordination et pour l'établissement du territoire. Les femelles peuvent également montrer un comportement agressif pour la défense de leur progéniture (comme les mâles). Le système olfactif est responsable du déclenchement de ce comportement agressif. En effet, des composés présents dans l'urine des congénères sont détectés par le système olfactif et traités dans le cerveau. Les bases cellulaires et moléculaires de ce phénomène restent peu connues. Pour comprendre la dynamique du réseau des circuits olfactifs dans le cerveau, il est essentiel d'enregistrer l'activité d'un grand nombre de neurones. L'imagerie cérébrale sur animal vigile nous permet de réaliser cet objectif. L'objectif est d'identifier les structures neuronales impliquées dans la mise en place d'un comportement agressif médié par le système olfactif. Nous effectuerons une imagerie directe des neurones et comparerons leur activité à partir de trois différents types de paradigmes de comportement social : l'agression mâle-mâle ; l'agression maternelle et l'établissement de la dominance. Nous comparerons ensuite les résultats avec une ligne de souris mutante pour la protéine-G *Gnai2* qui montre des déficiences dans ces comportements.

Ce projet utilisera 200 souris mâles et femelles.

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

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

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

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

11162 Les Licences et Master de Sciences de la Vie et de la Santé donnent aux étudiants les moyens d'acquérir les technologies de base, les méthodes de travail et les savoir-faire nécessaires à leur insertion sur le marché du travail ou à une poursuite de leurs études dans les domaines de la biologie et des biotechnologies de la santé. Or, les rongeurs sont largement utilisés en recherche (fondamentale et appliquée) et en développement dans ces domaines professionnels.

La mise en place de travaux pratiques utilisant des animaux vivants vise à familiariser les étudiants à l'expérimentation en physiologie animale, à leur enseigner les connaissances pratiques de techniques d'étude sur animal vivant et à les sensibiliser aux notions éthiques et réglementaires de l'expérimentation animale. Elle répond par ailleurs au référentiel de compétences en Licence précisant que les étudiants doivent être formés à "utiliser un dispositif expérimental sur un organe isolé, un animal adulte ou en cours de développement, en particulier connaître et utiliser des concepts et techniques de la physiologie animale". Cet enseignement pratique comprend au niveau de la de Licence trois TP : un TP d'initiation à l'expérimentation animale, et deux TP illustrant chacun une fonction physiologique majeure, respiratoire et cardiovasculaire ; au niveau Master (1^{re} année), un TP d'exploration cardio-respiratoire sur un modèle rongeur d'hypertension pulmonaire. La présente demande concerne ces quatre TP. La formation sera réalisée sur des rats adultes. Avec en moyenne 210 étudiants inscrits en Licence et 20 en Master par an et un total de 4 séances de TP, 220 rats seront utilisés chaque année, soit 1100 animaux pour la durée totale (5 ans) de ce projet. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les étudiants de Licence seront désormais par trinôme, alors qu'ils étaient en binôme dans la précédente demande d'autorisation, et une séance

de TP a été supprimée. Les expérimentations seront réalisées sur animaux anesthésiés (injection intrapéritonéale d'un anesthésique et d'un analgésique), et seront sacrifiés en fin de TP sans réveil. Chaque TP est encadré par des enseignants titulaires de la formation d'expérimentation sur animaux vivants (niveau concepteur) et de la formation à la chirurgie expérimentale des rongeurs. Une attention permanente sera portée au bien-être des animaux tout au long de la période des TP, notamment en assurant leur surveillance quotidienne et un enrichissement de leur milieu (tunnel en plastique et lanière de bois).

Plusieurs raisons expliquent le recours au modèle animal :

- 1- cette formation procure aux étudiants une première compétence d'expérimentation sur un animal vivant dans une formation qui oriente vers les métiers RD dans les domaines biomédicaux ;
- 2- elle permet l'acquisition des gestes techniques (pose de cathéters, recueil de liquides biologiques, monitoring de l'animal anesthésié) et la possibilité d'évaluer, les réponses physiologiques à différentes stimulations au niveau intégré sur l'organisme entier en conditions réelles.

11163 La prévalence de l'obésité est en constante augmentation au niveau mondial, ce qui contribue à intensifier les recherches permettant d'en comprendre les causes et de trouver les traitements adaptés. L'obésité résulte d'un déséquilibre entre les apports (alimentation) et les dépenses (exercice physique) d'énergie. Une des complications majeures dans l'obésité est l'apparition d'un diabète de type 2, ou diabète non insulino-dépendant, qui est un trouble de l'assimilation, de l'utilisation et du stockage des sucres apportés par l'alimentation. Le diabète de type 2 conduit à un taux de glucose dans le sang (glycémie) trop important ou hyperglycémie chronique.

Le GLP-1 (pour glucagon-like peptide-1) est une incrétine, une hormone intestinale qui stimule la sécrétion d'insuline pancréatique lorsque la glycémie est élevée, après un repas notamment. Il ralentit également la prise alimentaire par une action encore mal connue sur le cerveau. Les analogues du GLP-1 sont commercialisés afin d'aider les patients diabétiques à réguler leur glycémie. Cependant, malgré les nombreux effets avérés de ces molécules pharmacologiques, leurs mécanismes d'action sur le cerveau sont très mal connus.

Au laboratoire, nous avons utilisé un agent pharmacologique, l'exendine 4, un agoniste des récepteurs GLP-1 qui agit sur le même récepteur que cette incrétine. Nous avons déjà observé sur les modèles murins que l'injection d'exendine 4 dans le bulbe olfactif (BO) augmente les niveaux d'insuline dans le sang et diminue les concentrations de glycémie des souris obèses. Il s'agit donc d'un effet protecteur très prometteur et intéressant à étudier. Ceci est d'autant plus intéressant que le BO est une structure cérébrale qui permet de donner des indications sensorielles sur la toxicité ou l'aspect agréable des aliments et qu'un mauvais fonctionnement du BO serait impliqué dans l'obésité.

Dans ce projet, nous voulons donc identifier des mécanismes à l'origine de l'augmentation d'insuline plasmatique induite par injection d'exendine 4 dans le BO. Une voie possible de régulation du pancréas passe par le nerf vague qui fait partie du système parasympathique issu du cerveau et qui régule les paramètres physiologiques vitaux comme la digestion, la fréquence cardiaque ou la sécrétion d'insuline. Par conséquent, nous souhaitons voir si l'administration de GLP-1 et de produits pharmacologiques activateurs ou inhibiteurs des récepteurs du GLP-1 (agoniste : exendin 4, ou antagoniste : exendin 9) dans le BO de souris a un effet sur l'activité du nerf vague.

Dans ce projet, nous avons veillé à réduire le nombre de souris et à raffiner (améliorer) leurs conditions d'expérimentation.

>Pour procéder à nos expériences, et en nous limitant à un panel statistiquement représentatif, nous aurons besoin de 140 souris partagées en 2 groupes : souris témoins sous régime normal et souris obèses sous régime hypercalorique.

>Cette étude qui s'effectuera sur 2 ans ne peut se faire sur une autre espèce que la souris : par exemple, chez les invertébrés, il n'existe pas de pancréas ou de nerf vague. De plus, nous ne

pouvons pas réaliser ces expériences *in vitro* ou sur cultures de cellules puisque pour notre étude nous avons besoin d'étudier des paramètres sanguins.

>Nos protocoles ont été mis au point de façon à veiller au bien-être animal en améliorant leur environnement et en surveillant leur état de santé : notamment nous chercherons à éviter et limiter la douleur et la souffrance, à assurer des soins pré-, per- et post-opératoires adéquats, à recourir à l'anesthésie et à l'analgésie, à appliquer les points limites établis préalablement et, enfin, à utiliser les procédures réglementaires et appropriées de mise à mort.

11164 La Maladie d'Alzheimer (MA) est un enjeu majeur de santé publique à l'échelle mondiale. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients.

Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de contrecarrer l'évolution naturelle de la maladie. La découverte d'un nouveau traitement (seuls 4 médicaments peu efficaces actuellement sur le marché) pourra être considérée comme une révolution que ce soit en termes de nombre de patients (actuellement 26 millions de cas dans le monde ; 65 millions en 2030 en l'absence de nouveaux traitements. 870.000 cas en France) qu'en termes humains (répercussions sur la santé des conjoints) et financiers pour le système de santé. Nous avons déjà démontré l'efficacité d'une approche thérapeutique basée sur une thérapie génique qui consiste en l'administration d'un gène thérapeutique (impliqué dans le métabolisme du cholestérol) au moyen d'un vecteur viral par administration directe dans le cerveau.

Le but de notre projet est d'optimiser cette approche thérapeutique dans un modèle murin (souris) en injectant le vecteur viral par voie intraveineuse et ainsi de diminuer considérablement le risque chirurgical. Le bénéfice thérapeutique attendu est une amélioration de la mémoire. A terme, nous souhaitons proposer un essai clinique pour les patients souffrant de MA.

Remplacement : nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris) car aucun modèle *in vitro* ou de culture cellulaire ne permet aujourd'hui d'étudier les symptômes de perte de mémoire typiques de cette maladie. De plus, la souris est un modèle de MA bien caractérisé tant d'un point de vue comportemental que biologique (marqueurs histologiques ou moléculaires) pour évaluer le bénéfice thérapeutique associé à notre approche. Pour ce faire, nous utiliserons au maximum 4 modèles de MA déjà décrits.

Raffinement : En cas d'observation de la moindre douleur ou d'inconfort, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, après consultation du concepteur et du vétérinaire. Si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Réduction : enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques fiables. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de vecteurs viraux à injecter et les temps d'analyses. Ils ont également montré que l'étude de groupes de 15 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs en comportement, ainsi que dans les analyses biochimiques et de biologie moléculaire, réalisées sur de petits échantillons (1 hippocampes / souris). De plus, ce nombre d'animaux prend en compte la mortalité spontanée, ayant cours du fait du phénotype, particulièrement chez les APP/PS1 De9 (perte d'environ 10% dans un groupe APP/PS1 De9 non traité), et de l'âge des souris, allant jusqu'à 14 mois. Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 330 souris.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés dans des établissements reconnus. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux.

11165 Chaque année, 40.000 personnes sont victimes d'un arrêt cardiaque brutal en France. D'importants progrès ont été effectués afin d'améliorer la prise en charge de ces patients par des campagnes d'information sur la réanimation cardiopulmonaire et par l'installation de défibrillateur semi-automatique dans de nombreux lieux publics. Néanmoins, même lorsqu'une réanimation a pu être mise en place rapidement, la mortalité reste considérable à cause des séquelles neurologiques

et cardiaques. Expérimentalement, cette récupération peut être améliorée par le refroidissement rapide de tout l'organisme à l'aide d'une ventilation liquide totale. Cette approche consiste à instiller des liquides dans le poumon afin de refroidir très rapidement le cœur et le cerveau. L'instillation s'effectue par des dispositifs expérimentaux, appelés ventilateur liquidiens, qui ont montré leur efficacité et leur tolérance chez des porcs, des moutons et des lagomorphes.

Dans ce projet, nous proposons d'évaluer la faisabilité et la tolérance de la ventilation liquidienne hypothermisante chez des primates non humains (Macaques Rhesus ou Fascicularis). Il s'agit d'une étude de tolérance, sans induction d'un arrêt cardiaque. L'objectif est uniquement de déterminer les conditions dans lesquelles la ventilation liquide est parfaitement tolérée chez les primates. Pour ce faire, une première procédure sera mise en place chez deux primates pour lesquelles une anesthésie et une euthanasie doivent être envisagées pour les besoins d'autres protocoles. Ces deux primates seront réutilisés à partir d'un autre projet. Après anesthésie profonde, les deux animaux seront exposés à une heure de ventilation liquide avec des paramètres ventilatoires variables. Ces paramètres seront modifiés au cours de la procédure jusqu'à atteindre le seuil de volume et pression liquidiens pulmonaires précédents l'apparition des premiers dommages pulmonaires. Les animaux seront ensuite euthanasiés, comme prévu dans la procédure dans laquelle ils étaient initialement inclus. Sur la base des paramètres ventilatoires les mieux tolérés, et en connaissance des résultats obtenus précédemment dans d'autres espèces, l'effet de la ventilation liquide sera alors évalué sur 3 Macaques supplémentaires qui seront anesthésiés et exposés à 30 min de ventilation liquide. Les animaux seront ensuite réveillés et exposés aux soins nécessaires. En l'absence de symptôme spécifique, ils seront surveillés pendant au moins 2 mois sur des critères cliniques. Ils sortiront ensuite du projet.

Pour conduire ce travail, l'usage de la recherche animale ne peut pas être évité puisqu'il s'agit de l'évaluation préclinique d'un dispositif médical dans un contexte qui doit prendre en compte l'ensemble des interactions entre les organes (poumon, cœur, cerveau, etc). L'étude sera réalisée chez cinq primates.

Conformément aux conditions définies par la réglementation française, les animaux seront hébergés par paires, sauf dans certains cas (agressivité envers ses congénères, soins vétérinaires, pas de partenaires compatibles disponibles). Une attention particulière sera portée au maintien de la socialisation dans le cas d'hébergement individuel. Ils seront toujours en contacts visuels et olfactifs avec leurs congénères. Les animaux seront aussi intégrés à un programme d'enrichissements complexe (structurels, alimentaires, manipulables)

Avant d'exposer les animaux à la procédure dans laquelle ils seront réveillés, une première procédure a été prévue chez deux animaux devant être euthanasiés pour un autre projet afin de confirmer que les conditions ventilatoires supposées sont appropriées. Le risque d'apparition de trouble pulmonaire après le réveil des animaux est donc faible et l'objectif de l'étude est de le confirmer avant un éventuel transfert chez l'homme. Les animaux feront l'objet de tous les soins nécessaires, notamment l'administration d'antalgique puissants au décours de leur anesthésie.

11166 'Contexte :

Les plaquettes sanguines (PLT) jouent un rôle fondamental dans les processus d'hémostase. Elles nous permettent d'éviter les hémorragies en cas de blessures, de lésions, de traitements anticancéreux par chimiothérapie ou radiothérapie quand le taux de plaquettes circulantes diminue. En dessous de 30 000 plaquettes par micro litre (μL) de sang le risque d'hémorragie interne est important et peut mettre en danger la vie du patient. Afin de circonscrire ce risque, une transfusion de plaquettes obtenues par un don de sang volontaire est souvent nécessaire.

Les procédés de fabrication des plaquettes à visée transfusionnelle sont en perpétuelle évolution pour automatiser leur préparation, améliorer leur condition de stockage, étendre leur durée de conservation, éviter les risques de transmission de pathogène du donneur au receveur par des procédés d'inactivation. En première intention, ces nouveaux produits sont testés sur le plan fonctionnel et biochimique *in vitro*. L'étape suivante est une évaluation *in vivo* pour s'assurer de leur capacité à recirculer et à assurer les fonctions hémostatiques.

Les études de recirculation et de survie nécessitent de pouvoir distinguer les plaquettes transfusées à tester des plaquettes du receveur. La méthode standard utilise un marquage des plaquettes « test » avec des isotopes radioactifs comme l'Indium 111 (¹¹¹In).

Objectif :

Une méthode alternative, serait de marquer les plaquettes à la biotine (vitamine B8) et de révéler ensuite, *ex vivo*, les plaquettes dans la circulation avec de la streptavidine fluorescente en cytométrie en flux. Les avantages principaux de la méthode sont de pouvoir suivre plusieurs populations de plaquettes marquées avec différentes densités de biotine chez un même sujet et de s'affranchir de la radioactivité. La production de ces plaquettes marquées « injectables » étant réalisée en circuit ouvert, elle doit répondre aux normes bonnes pratiques de fabrication (BPF).

Notre objectif est de mettre au point le multi-marquage des plaquettes au grade « injectable » destinées à des études cliniques chez des volontaires sains.

Méthodologie

Préalablement aux études cliniques chez l'homme, il est nécessaire de caractériser ces plaquettes marquées à différentes densités de biotine et produites selon les normes BPF sur un plan fonctionnel avant et après recirculation dans une souris transgénique NOD.Gg-PrkdcscidIL2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) immunodéficiente qui tolère les plaquettes humaines. Nous évaluerons l'impact de la biotine sur : A.la recirculation et la durée de vie des plaquettes par cytométrie en flux *ex vivo*.

B.les propriétés hémostatiques des plaquettes en réalisant un test de correction du temps de saignement

C.La capacités des plaquettes à former un thrombus hémostatique dans un modèle de lésion induite par un faisceau laser sur une artère mésentérique.

Une attention particulière sera portée au respect des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) :

Réduction

Grâce à un marquage avec différentes densités de biotine, il est possible d'étudier la recirculation et la survie de plusieurs populations de plaquettes dans la même souris et ainsi limiter le nombre de souris receveuses.

Pour les protocoles A, B, C le nombre d'animaux est calculé afin d'obtenir suffisamment d'évènements informatifs pour permettre une analyse statistique de variance suivie d'un post test Bonferroni (protocoles A et C) et log rang test (protocole B).

Remplacement

Tous les tests de caractérisations de ces plaquettes humaines (hPLTs) marquées avec différents niveaux de biotine ont été réalisés *in vitro*. Cependant avant de pouvoir envisager une utilisation chez l'homme (étude clinique), il est absolument nécessaire de s'assurer de leur fonctionnalité *in vivo* dans un modèle animal qui tolère les plaquettes humaines.

Raffinement

Afin de pouvoir étudier la circulation des plaquettes humaines chez la souris, nous sommes obligés utiliser des animaux immunodéficients. Tous les éléments constituant leur environnement seront stérilisés afin de limiter l'exposition de ces animaux aux pathogènes. Les plaquettes étudiées sont de qualité « injectable » humaine. Les expériences seront réalisées sous une hotte à flux laminaire. Les conditions de bien-être sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Lors des procédures, les animaux sont anesthésiés, ils sont maintenus sur une table chauffée à 38°C pour maintenir leur température centrale à 37°C. Les injections et prélèvements sont faits sous anesthésie générale additionnée le cas échéant d'une analgésie. Une surveillance particulière est portée aux points d'injections et de prélèvement afin de déceler la moindre anomalie et ainsi de prendre les dispositions adéquates. Lors des procédures, les animaux sont anesthésiés, ils sont maintenus sur une table chauffée à 38°C pour maintenir leur température

centrale à 37°C. Les injections et prélèvement sont faits sous anesthésie générale additionnée le cas échéant d'une analgésie. Une surveillance particulière est portée aux points d'injections et de prélèvement afin de déceler la moindre anomalie et ainsi de prendre les dispositions adéquates. Une fiche de suivi sera mise en place pour suivre l'état des animaux et veiller à leur bien-être tout au long de l'expérimentation.

Résultats attendus

Par cette étude nous espérons démontrer que la biotinylation des plaquettes sanguines n'affecte pas leur capacité hémostatique *in vivo* ce qui permettra de développer de nouvelles méthodes pour tracer les plaquettes dans la circulation sanguine. Ces développements permettront de qualifier de nouveaux procédés de fabrication de concentrés plaquettaires à usage transfusionnel et aussi dans le domaine de l'hématologie pour évaluer l'efficacité de traitements.'

Ce projet nécessitera 70 souris NSG.

11167 Dans certains pays européens comme le Royaume Uni, l'Irlande et la France, la faune sauvage, et en particulier les blaireaux, est infectée par la tuberculose bovine dans les zones où la maladie circule chez les bovins (zone d'enzootie). Dans ces zones, les blaireaux peuvent entretenir l'infection compliquant l'éradication chez les bovins de cette maladie transmissible à l'homme.

En France, l'infection par l'agent de la tuberculose bovine, *Mycobacterium bovis*, a été diagnostiquée chez les blaireaux, mais aussi les sangliers et plus rarement les cerfs et les chevreuils, dans les zones infectées en Bourgogne (dans le département de la Côte d'Or) et en Nouvelle Aquitaine (notamment dans les départements de la Dordogne, de la Charente, des Pyrénées-Atlantiques, des Landes et du Lot-et-Garonne).

Bien que sensible à la tuberculose à *Mycobacterium bovis*, comme tous les mammifères, le renard n'avait été que rarement trouvé infecté dans des zones d'enzootie jusqu'en 2015 en France. Mais en 2015, en Dordogne, 4 renards des 6 analysés issus d'une petite zone au cœur de la zone infectée au nord du département ont été trouvés infectés. L'ADN de la bactérie a été isolé dans la salive, l'urine et les fèces d'un des 4 renards positifs, montrant une possibilité d'excrétion du germe et donc un risque de contamination du milieu et d'autres animaux. Cette découverte et des résultats obtenus en Côte-d'Or montrant les visites fréquentes de renards dans les bâtiments d'élevage, soulève la question du rôle des renards dans le maintien et la diffusion de la tuberculose bovine localement dans les zones infectées. Une étude de terrain de 2 ans est actuellement en cours dans 25 communes en Dordogne au cœur de la zone infectée, autour de la zone de provenance des 4 premiers renards trouvés infectés, pour étudier ce possible rôle des renards (estimation de la proportion d'animaux infectés et d'animaux excréteurs). Les premiers résultats de la première année d'étude mettent en évidence d'autres renards infectés et capables de disséminer la bactérie dans leur fèces notamment, dans une zone où l'infection par la tuberculose en élevage et dans la faune sauvage est préoccupante. Au-delà de cette étude sur le terrain, il apparaît donc nécessaire de mieux connaître le déroulement de l'infection à *Mycobacterium bovis* chez les renards, ce qui n'a jamais été fait précédemment, et de vérifier si le vaccin en cours de mise au point pour protéger les blaireaux serait efficace de la même manière pour protéger les renards notamment par administration orale.

Ce projet vise donc dans un premier temps à mieux connaître l'infection à *Mycobacterium bovis* chez le renard et à étudier l'excrétion de bacilles tuberculeux, puis à vérifier si une vaccination par le BCG peut le protéger et/ou réduire cette excrétion.

Tout d'abord, une infection expérimentale permettra de suivre la maladie chez le renard, de suivre l'excrétion de la bactérie et de valider des outils diagnostiques. L'étude de la protection vaccinale sera faite en trois étapes, chaque étape devant être validée avant de passer à la suivante. Tout d'abord on utilisera une présentation injectable du vaccin pour vérifier que le BCG peut protéger le renard. Si cet essai montre un effet protecteur, une présentation orale sera testée en instillant la dose vaccinale dans la gueule des renards (afin de n'avoir aucune variation de dose comme lors de la prise d'un appât oral). Si un effet protecteur est mis en évidence, un essai sera réalisé avec des appâts vaccinaux.

Ce projet utilisera au maximum 54 animaux pendant les 5 années de l'étude.

Afin de suivre la règle des 3Rs, ce projet utilise le nombre minimal d'animaux pour obtenir des données fiables. Différents enrichissements sont apportés (balles, caisses en carton, morceaux de bois, os de jambon à ronger) et sont changés régulièrement. De plus une caisse-abri est placée dans la cage des animaux. Enfin, toutes les manipulations faites par une équipe entraînée à la capture, à la contention et à la réalisation de prélèvements. Concernant l'infection, d'après les résultats observés sur d'autres espèces, les doses de bactéries utilisées permettront l'apparition de premières lésions minimales mais sans atteinte de l'état général au cours de la période d'observation post-infection. Un point limite est tout de même défini afin de réduire au maximum la contrainte imposée aux animaux. De plus différents prélèvements réalisés au cours de l'étude permettront de valider des outils diagnostiques utilisés par la suite dans le suivi de l'infection sur le terrain.

11168 Les organismes parasités sont généralement plus sensibles aux polluants. Quelques rares études suggèrent cependant un transfert et une bioaccumulation des polluants vers les parasites et un potentiel bénéfique pour les hôtes à être parasités en milieux pollués.

Lors d'une étude de terrain en 2016, nous avons mis en évidence que les parasites acanthocéphales (*Pomphorhynchus laevis*) présentaient des teneurs bien plus élevées en HAPs (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, principaux composés organiques incriminés dans la contamination des cours d'eau européens) que leur poisson hôte, les chevesnes (*Squalius cephalus*). De plus, les chevesnes parasités présentaient des niveaux de stress oxydant significativement plus faibles que les poissons non parasités. Sachant que la métabolisation des HAPs par les poissons peut induire des dommages oxydatifs importants, nos résultats suggèrent une détoxification du poisson-hôte par les parasites et une diminution des effets délétères des HAPs chez les poissons parasités.

Ce projet vise à tester expérimentalement le transfert de HAPs des chevesnes vers leurs parasites intestinaux, les acanthocéphales, en prenant en compte les produits de métabolisation des HAPs. D'autre part, les effets moléculaires, physiologiques et corporels du parasitisme et de l'exposition aux HAPs seront étudiés, notamment en termes de stress oxydant. 200 chevesnes naturellement parasités et non parasités (environ 50% d'occurrence de ce parasite, d'après une étude de terrain) seront exposés via l'alimentation à des niveaux « faibles », « modérés » et « élevés » d'HAPs dans une gamme cohérente avec les niveaux mesurés dans l'environnement.

- Remplacer : Il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car nous cherchons à étudier les réponses physiologiques et écologiques des poissons suite à une exposition à de multiples facteurs de stress (parasitisme et pollution).

- Réduire : Un effectif de 50 poissons maximum sera utilisé par groupe de traitement. Cet effectif tient compte de la prévalence de parasites retrouvés dans les chevesnes en milieux naturels. Le nombre de réplicas a été adapté au plus juste pour permettre à la fois d'obtenir une puissance statistique suffisante mais également de pouvoir quantifier la réponse individuelle des poissons.

- Raffiner : La manipulation des animaux sera réalisée sur des individus préalablement anesthésiés et les prélèvements sur des poissons euthanasiés et ce, dans les conditions réglementaires. Un suivi sanitaire régulier des poissons sera effectué en se basant sur l'établissement de points limites et permettra de réagir rapidement à l'apparition de symptômes attestant d'une quelconque souffrance animale.

11169 La résistance à l'insuline est un trait caractéristique du diabète de type 2 (DT2) et joue un rôle majeur dans la pathogénèse de la maladie. Dans des situations d'obésité, le gras s'accumule dans les muscles, le foie et les cellules bêta-pancréatiques (cellules produisant l'insuline) où il est transformé en dérivés lipidiques spécifiques. Le but de ce projet est de mettre en évidence l'accumulation d'un dérivé lipidique dans l'apparition du diabète de type 2. En changeant artificiellement les niveaux d'expression d'un lipide, nous espérons mettre en évidence son accumulation dans la circulation aura des conséquences positives sur la sensibilité à l'insuline des

cellules. Travailler sur l'animal entier nous permettra d'évaluer les conséquences de perturbations métaboliques observées dans les tissus périphériques sur l'animal entier.

Nous avons choisi d'utiliser la souris comme modèle métabolique intégré. Ce modèle est le seul disponible actuellement et permet de reproduire facilement des situations physiopathologiques normalement observées chez l'homme.

Ce projet prévoit d'utiliser 276 souris sur 3 ans. Cet effectif est nécessaire pour obtenir des résultats homogènes lors de tests métaboliques pratiqués dans ce projet. Il est à noter que nous réutilisons les mêmes souris pour plusieurs procédures, réduisant ainsi le nombre total d'animaux sacrifiés.

Le bien-être des animaux est au cœur de nos préoccupations. Ainsi, des protocoles d'enrichissement de l'environnement de l'animal seront mis en place avec notamment la présence de nids végétaux. Notre projet comportant l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés, une attention très particulière sera portée à ces animaux afin de déceler tout comportement anormal. Enfin, l'euthanasie des animaux sera réalisé sur des animaux préalablement anesthésiés.

11170 Les cancers du système nerveux central (CNS) sont un ensemble hétérogène de tumeurs, issues de tissus différents, dont le point commun est de se développer dans le cerveau ou dans la moelle épinière. 90% des cancers CNS sont localisés dans le cerveau et 10% dans la moelle épinière. Bien qu'elles soient plus fréquentes chez les personnes âgées, les tumeurs cérébrales touchent les adultes à tout âge ainsi que les enfants. Chez ces derniers, ce sont les tumeurs solides les plus fréquentes et elles représentent 25% des cancers pédiatriques. Grâce à l'avancée des nouvelles biotechnologies, nous savons aujourd'hui qu'il existe de multiples sous-types de tumeurs cérébrales qui sont biologiquement et cliniquement différents. Pourtant, malgré une meilleure compréhension de leur biologie et de leurs mécanismes d'actions, ces cancers sont ceux pour lesquelles les progrès thérapeutiques ont été les moins importants au cours de ces dernières décennies. En effet, 90% des drogues testées ayant donné des premiers résultats prometteurs en laboratoire, sur des lignées cellulaires et des modèles *in vivo* classiques, n'ont pas donné de résultats concluants lors d'essais cliniques. Il est donc essentiel de développer des modèles précliniques adéquats afin de limiter le nombre de ces échecs et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques performantes.

A l'heure actuelle, les modèles de greffes de tumeurs de patients sur souris ou Patient Derived tumor Xenografts (PDX) sont les modèles qui permettent au mieux de récapituler les caractéristiques des cancers humains en reproduisant toutes les étapes et aspects de la pathologie. Les résultats obtenus dans les modèles PDX déjà développés montrent une réelle corrélation avec les réponses cliniques obtenus chez les patients.

L'objectif de ce projet est d'établir 20 nouveaux modèles PDX sur 2 ans par injection intracérébrale de cellules provenant de fragments de tumeurs de patients (10) ou lors du transfert de modèles primo-implantés par des équipes académiques (10). L'établissement de ces modèles se fera dans le respect des lois en vigueur après obtention du consentement éclairé des malades. Le nombre de souris utilisés (1352) dans ce projet se justifie par un processus de développement exigeant et nécessaire pour établir des modèles PDX fiables et utilisables comme modèles précliniques.

Dans un souci du respect de la règle des 3R (Remplacement-Réduction-Raffinement) :

- Les modèles PDX de tumeurs cérébrales sont indispensables car ces modèles sont les seuls permettant de reconstituer sur animal la complexité des cancers humains et bien que l'environnement cellulaire soit constitué de tissus de souris, ce sont sans doute les modèles qui s'approchent le plus de la maladie humaine.

- Le développement et la mise à disposition d'une collection de modèles PDX représentant l'hétérogénéité des différents types de tumeurs cérébrales permettront une meilleure évaluation des médicaments antitumoraux, entraînant une réduction du nombre d'animaux utilisés dans les études futures.

- Les souris seront regroupées au minimum par deux et au maximum par six dans des cages changées hebdomadairement et manipulées dans des conditions d'hygiène rigoureuse afin de garantir un statut sanitaire optimal. Pour atténuer la souffrance et le stress infligés aux animaux, ils seront anesthésiés lors de toute greffe et recevront une dose d'analgésique dans l'eau de boisson

en pré- et post-opératoire. Les animaux seront monitorés quotidiennement (état physique et comportement) et le milieu est systématiquement enrichi avec du papier kraft, des bâtons de bois et des maisons en carton pourront être ajoutés. Si les cellules greffées sont transductibles avec un plasmide codant le gène de la luciférase, une technique d'imagerie par bioluminescence sera utilisée pour monitorer, de façon non-invasive, l'évolution de la tumeur. Associée aux observations quotidiennes effectuées sur les animaux, elle nous permettra de contribuer à leur bien-être.

11171 Le cancer chez les enfants et les adolescents est un événement rare qui représente environ 1% de l'ensemble des cancers. Bien que rares, ils constituent la deuxième cause de mortalité entre 1 et 14 ans après les accidents et la première cause de décès par maladie pour cette tranche d'âge. Actuellement, les taux de guérison restent très faibles pour certaines formes de cancers avec moins de 10% pour les tumeurs cérébrales de haut grade et environ 30% des patients atteints de neuroblastome et sarcome d'Ewing restent en échec thérapeutique malgré des protocoles de radiothérapie et/ou de chimiothérapie à haute dose, qui peuvent être associés à une importante toxicité.

Compte tenu de la rareté du matériel tumoral, le développement de modèles de xénogreffes à partir du matériel tumoral issu des patients est essentiel pour pouvoir proposer les modèles expérimentaux les plus adaptés et les mieux caractérisés pour comprendre développement de ces maladies en échec thérapeutique mais également permettre l'exploration de l'activité de nouveaux médicaments. Pour respecter la règle des trois R, nous développons en parallèle des modèles alternatifs de type culture cellulaire pour soutenir nos hypothèses qui devront ensuite être validées *in vivo*, comme par exemple l'efficacité anti-tumorale d'un médicament. Néanmoins, ces modèles alternatifs ne nous permettent pas encore de pouvoir appréhender le comportement tumoral dans son propre environnement qui peut être exploré dans modèles orthotopiques (xénogreffe dans le site originel du matériel tumoral) mais également la réponse au traitement qui implique souvent différents systèmes au sein de l'organisme et qui nécessite principalement des modèles de xénogreffes sous-cutanées autrement appelés PDX (patient derived xenograft). Pour cela, nous implanterons, dès réception, des greffons issus du matériel tumoral soit sous forme de suspension cellulaire pour les localisations orthotopiques qui impliquent des volumes d'injection faibles, soit sous forme de pièces tumorales de moins de 5 mm³ pour les localisations sous cutanées. Pour limiter la douleur engendrée par le développement de la tumeur, les animaux pourront recevoir un antalgique adapté (Pour limiter la douleur induite par la chirurgie, les souris reçoivent 0,1 mg/kg de buprénorphine par voie sous cutanée (10mL/kg) au décours de la chirurgie puis pendant 2-3 jours 2 fois par jour. D'après notre expérience passée, le taux de prise tumorale avoisine 50 % toutes tumeurs confondues et aucune modélisation statistique ne nous permet de modéliser le taux de prise tumoral qui reste très variable, même au sein d'une même indication. Dans ce contexte et afin d'obtenir un panel de modèles reflétant la variabilité inter-tumorale pour les différents types tumoraux, nous grefferons la totalité des tumeurs qui seront mises à notre disposition. Pour chaque tumeur, nous grefferons au maximum 10 souris sous anesthésie : 5 orthotopiques et 5 sous-cutanées, et pour limiter le nombre d'animaux utilisés, une seule tumeur par modèle (ortho vs sc) sera transplantée consécutivement trois fois de manière à évaluer leur stabilité et caractériser ces PDX en vue d'exploration fonctionnelle ou thérapeutique. Ce projet porte le nombre maximum théorique d'animaux utilisés à 10000 soit 2000 par an (si toutes les xénogreffes prennent à 100%). En pratique, d'après notre expérience, il est probable que ce nombre approchera en fait 1000 animaux par an soit un total de 5000.

11172 Ki-67 est une protéine présente uniquement dans les cellules qui prolifèrent dans les vertébrés. Son analyse dans les biopsies est très répandue pour grader les tumeurs dans le cancer. Nous avons récemment montré que le gène correspondant n'est pas nécessaire pour la prolifération des cellules, ni pour la santé ou le bien-être des souris. En revanche, la diminution de son niveau dans les cellules cancéreuses ralentit la croissance des tumeurs. De ce fait, Ki-67 devient une cible thérapeutique potentielle. Dans ce projet, nous voulons explorer son rôle dans la tumorigenèse. Des tests en amont ont été réalisés dans des cellules en culture, qui montrent que les cellules

dépourvues de Ki-67 ont moins de caractéristiques cancéreuses que les cellules témoins. Il est désormais important de réaliser des expériences *in vivo*, le seul moyen de confirmer si Ki-67 peut constituer une cible thérapeutique. Nous voulons tester si des souris dépourvues du gène Ki-67 (Ki-67 -/-) sont protégées contre le cancer dans l'intestin. Nous voulons aussi tester si l'enlèvement du gène dans les cellules déjà cancéreuses inhibe la progression tumorale. Nous allons faire trois types d'expériences. D'abord, nous allons tester si les souris Ki-67-/- résistent à une carcinogenèse induite chimiquement dans l'intestin. Deuxièmement, nous croiserons les souris invalidées pour le gène de Ki-67 avec des souris génétiquement prédisposées à une initiation de la tumorigenèse dans l'intestin. La troisième type d'expérience est une greffe de cellules déjà cancéreuses invalidées ou non pour le gène Ki67, pour observer des effets éventuels du ralentissement de la progression tumorale dans la tumorigenèse du sein ou du foie. Ces modèles ont été choisis et conçus (points limites) pour répondre à la question de l'utilité de Ki-67 comme cible thérapeutique dans le cancer tout en étant le moins délétère possibles pour les animaux. Les souris seront surveillées quotidiennement. Le suivi du poids corporel des animaux sera réalisé 3 fois par semaine. Le suivi de la croissance tumorale sera réalisé 2 fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse et / ou par imagerie en bioluminescence. Un total de 144 souris est nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement valides pour l'ensemble des trois types d'expériences et éviter leur répétition inutile, ainsi limitant le nombre d'animaux utilisés. Ce nombre comprend des expériences pilotes permettant d'établir les conditions nécessaires et ainsi réduire le nombre total d'animaux utilisés. Nos expériences avec les animaux seront aussi complétées par des expériences complémentaires en utilisant uniquement des cellules en culture.

11173 Les rhumatismes inflammatoires correspondent à une inflammation articulaire dans le cadre de maladies générales de l'organismes avec un risque de handicap et une baisse de la qualité de vie dont la cause est inconnue.

Les causes des rhumatismes inflammatoires restent mal connues.

Le but de notre recherche est d'étudier si des modifications au niveau du tube digestif peuvent changer l'issue de l'arthrite. En cas de résultats positifs, ce projet permettrait une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de l'arthrite et participerait à ouvrir la voie vers de nouvelles approches thérapeutiques.

L'exploration du lien entre le tube digestif et l'arthrite inflammatoire doit tenir compte des interactions complexes entre le contenu du tube digestif et les nombreuses structures mécaniques, chimiques et immunologiques présentes dans l'intestin. L'étude de la physiologie gastro-intestinale ne peut être réalisée que sur des animaux puisqu'à ce jour aucun système cellulaire ne permet de reproduire les interactions complexes.

Nous avons choisi d'utiliser des modèles murins pour des raisons de faisabilité, les modèles d'arthrite expérimentale étant largement documentés dans la littérature, y compris des souris transgéniques qui développent spontanément un phénotype dommageable à l'âge adulte.

Ce projet durera 5 ans et utilisera au maximum 676 souris.

Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type et sur notre volonté de suivre au plus près la règle des 3R. Ainsi, le nombre de souris sera réduit au strict minimum pour obtenir des résultats pertinents statistiquement. Le nombre de souris à utiliser a été calculé à l'aide d'un biostatisticien dans but d'en estimer le nombre suffisant pour obtenir des résultats. Ce nombre tient compte du nombre nécessaire de contrôles. Il tient également compte de la nécessité de reproduire les résultats, afin de pouvoir identifier et exclure des artefacts expérimentaux et ainsi éviter des erreurs d'interprétation.

Les souris seront hébergées en groupe de 6 individus maximum dans des cages sur des portoirs ventilés. Au cours d'une procédure, les souris sont observées régulièrement afin de détecter d'éventuels signes de douleur, de souffrance ou de stress.

5 procédures seront mises en œuvre pour mener à bien ce projet. Elles peuvent entraîner des souffrances modérées. En ce sens, afin de détecter précocement une souffrance nous utiliserons une grille d'évaluation clinique. En cas de nécessité, des mesures de renforcement seront mises en

place comme faciliter l'accès à la nourriture dans la cage avec du gel humidifié afin de faciliter la vie de l'animal et la surveillance sera rapprochée. Des points limites éthiques sont définis pour chaque procédure expérimentale. Si ces points limites sont atteints les souris seront immédiatement euthanasiées.

A terme (fin du protocole) les souris seront euthanasiées à moins que les points limites soient atteints avant.

11174 Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques spécifiques des antigènes de tumeur sont capables de tuer les cellules tumorales et jouent un rôle protecteur dans l'immunité anti-tumorale. L'activation des lymphocytes T CD8+ peut avoir lieu pendant la croissance tumorale. Cependant, si ce processus est insuffisamment efficace, l'immunothérapie permet d'augmenter les réponses T CD8+ protectrices anti-tumorales. Le but du projet est de comprendre les mécanismes permettant d'activer les lymphocytes T CD8+ tuant les tumeurs. Nous étudions les cellules dendritiques (CD) qui sont responsables de l'activation des lymphocytes T CD8+ spécifiques. Les CD activent les lymphocytes T CD8+ par un processus appelé la présentation antigénique par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Nous étudions spécifiquement les bases moléculaires de la présentation antigénique par les CD car c'est une étape limitante du développement des réponses immunitaires anti-tumorales spontanées ou induite par des immunothérapies. Il est indispensable de comprendre les bases moléculaires et cellulaires de la fonction des CD pour développer des immunothérapies plus efficaces.

Nous utilisons des souris de laboratoire. Le maximum de souris utilisées pendant la durée du projet (5 ans) est 2776 souris.

Les procédures utilisées sont légères ou modérées. Nous n'utilisons pas de modèles inflammatoires chroniques.

Dans une première série d'expériences nous testons la capacité de formulations d'immunothérapies vaccinales à induire une réponse T CD8+. Les traitements d'immunothérapies n'induisent pas de souffrance particulière. Les animaux sont euthanasiés à la fin des expériences pour analyser des réponses immunitaires cellulaires *ex vivo*.

Dans une deuxième série d'expériences, afin de tester les réponses T CD8+ dirigées contre les tumeurs, les animaux sont greffés avec des lignées de tumeur. Dans ce cadre, nous testons la capacité de différents traitements immuno-thérapeutique à : 1) induire une régression tumorale ; 2) induire des réponses immunitaires de type CD8+. Les animaux sont sacrifiés à la fin des expériences pour analyser des réponses immunitaires cellulaires *ex vivo*.

Afin d'établir les mécanismes moléculaires contrôlant le développement des réponses immunitaires T CD8+ ; nous utilisons des animaux mutants pour des gènes candidats dans les schémas expérimentaux précédemment évoqués. Ces animaux sont génétiquement modifiés mais le type de modification que nous étudions n'induisent pas de « phénotype dommageable », c'est à dire de défauts de développement ou d'inflammation chronique réduisant le bien-être des animaux.

Le modèle murin permet de modéliser de façon réaliste le développement des réponses immunitaires anti-tumorales. En comprenant les gènes qui contrôlent le développement des réponses T CD8+ anti-tumorales, nous identifierons de nouvelles cibles pour le développement d'immunothérapies plus efficaces. En particulier, une compréhension accrue des molécules contrôlant la fonction d'activation des CD8+ par les CD devrait ouvrir de nouvelles perspectives en immunothérapie anti-cancéreuse. En conséquence, ce projet devrait permettre de contribuer à développer des immunothérapies améliorant la santé humaine, le traitement des cancers en particulier. De façon importante, les modèles pré-cliniques que nous utilisons permettent de sélectionner les stratégies immuno-thérapeutiques les plus efficaces à tester dans le cadre d'essais cliniques. Cette recherche limite donc les risques associés aux essais cliniques infructueux.

Notre approche expérimentale prend en compte l'objectif des 3 Rs :

Remplacer : Ni la modélisation mathématique, ni les systèmes *in vitro* ne permettent d'étudier les réponses T CD8+ anti-tumorales induite par les tumeurs ou la vaccination immunothérapeutique.

Réduire : les résultats attendus à l'issue de ce projet n'ont pas été publiés à ce jour dans la littérature scientifique. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet a été réduit au minimum pour chaque modèle tout en assurant des résultats statistiquement interprétables. Afin d'intégrer l'objectif de la réduction dans notre démarche, nous avons développé des schémas expérimentaux permettant l'analyse, après euthanasie, d'un nombre élevé de paramètres, et ce, dans plusieurs organes. Cette approche, alliée au calcul de puissance par Student, permet de réduire le nombre d'animaux par groupe expérimental à 7.

Raffiner : Afin de minimiser l'impact des procédures, nous allons anesthésier les souris avec ketamine-xylazine dans tous les protocoles incluant l'injection de cellules tumorales.

Les signes cliniques permettant d'évaluer l'état de douleur ou détresse seront évalués systématiquement quotidiennement à l'aide d'une grille d'évaluation multiparamétrique. Un point limite est défini à l'aide de cette grille. Les souris atteignant le point limite sont immédiatement euthanasiées.

11175 La recherche des mécanismes fondamentaux conduisant un tissu sain à se transformer en tissu cancéreux reste une question d'importance majeure. Nos données indiquent que le nombre de cellules tuft, un type de cellules épithéliales particulier, augmente de manière drastique lors des premières phases de cancers digestifs, dont ceux touchant l'estomac, le pancréas et l'intestin. Cette étude se propose de comprendre le rôle joué par ces cellules dans la tumorigenèse et dans la régénération de la muqueuse colique, ces deux processus étant liés. Ce projet sera mené selon les modalités du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». (1) L'étude de l'inflammation est un phénomène complexe, impliquant de nombreux types cellulaires, non reproductible *in vitro*. Nous utiliserons des souris transgéniques de tester nos hypothèses de travail dans un modèle intégré (2) L'élevage des animaux se fera dans un milieu enrichi (maisonnette, carrés de cellulose) sous la supervision de personnels qualifiés des animaleries. Les animaux feront l'objet d'un suivi scrupuleux permettant d'anticiper l'atteinte des points limites, et seront manipulés sous anesthésie lors des phases expérimentales. (3) Le nombre d'animaux requis pour ce projet a été défini selon une approche statistique rigoureuse permettant d'atteindre nos objectifs scientifiques. De plus, nous utiliserons des animaux des deux sexes *a priori*, ceci permettant de réduire le nombre d'individus à produire. Ce projet sera basé sur l'utilisation de modèles murins afin de se rapprocher au mieux d'un contexte de physiologie intégrée. Nous utiliserons 4 lignées transgéniques, soit un total d'animaux estimé à 420 individus, sur une durée totale de projet de 3 années.

11176 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

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

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

particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

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

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

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

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

11177 Le nombre de personnes atteintes de diabète de type 2 (DT2) est en progression constante. Cette pandémie est attribuée au mode de vie « occidental », qui est associé à la sédentarité et à l'obésité, ainsi qu'au vieillissement de la population. La fédération internationale du diabète prévoit que le nombre de diabétiques pourrait passer de 285 millions en 2010 à 438 millions en 2030 au niveau mondial, ce qui rend fondamental l'identification de nouvelles thérapeutiques pour freiner le développement de cette maladie, les traitements actuels du DT2 agissant uniquement sur le contrôle de la glycémie et non sur l'apparition ou la progression de la maladie.

Le DT2 est caractérisé par un taux de sucre élevé dans le sang (hyperglycémie chronique) due à la mort des cellules β qui produisent l'insuline dans le pancréas. La maladie est due à une production insuffisante d'insuline (insulinopénie) par les cellules β . Les mécanismes impliqués dans le développement de cette pathologie sont nombreux, et certains sont encore mal connus. L'accumulation de dépôts amyloïdes dans les cellules β , qui sont observés chez plus de 90% des patients atteints de DT2, pourrait contribuer de manière significative au dysfonctionnement et à la mort des cellules β et au développement de la maladie. Les dépôts amyloïdes sont composés principalement d'une forme mal repliée et agrégée d'une hormone impliquée dans la régulation de la glycémie : la protéine IAPP (Islet Amyloid PolyPeptid). Des données récentes indiquent que le DT2 serait une maladie du repliement des protéines au même titre que les maladies à prions (Creutzfeldt-Jacob), les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou la sclérose latérale amyotrophique. Ces maladies sont aussi appelées maladies « prion-like » car elles présentent des similitudes avec les maladies à prions au niveau de la propagation de la forme pathologique de la protéine IAPP et de son agrégation sous formes de fibres amyloïdes. Dans le cas du DT2, il a été démontré que la protéine IAPP se comporte comme un prion, c'est-à-dire qu'elle adopte un repliement qui mène à

son agrégation sous forme de fibres amyloïdes et qu'elle est capable de transmettre ce repliement pathologique à des protéines IAPP non agrégées. Le fait que la protéine IAPP se comporte comme un prion n'implique pas que le DT2 soit une maladie infectieuse. Le terme « prion-like » ne concerne que le mécanisme de propagation du repliement pathologique de la protéine et son agrégation.

Notre groupe étudie les mécanismes de propagation des protéines se comportant comme des prions dans le cadre de diverses pathologies, dont les maladies à prions représentent un prototype. Nous avons identifié un mécanisme cellulaire impliqué dans la propagation des prions ainsi que des composés médicaments actifs ciblant ce mécanisme cellulaire. L'objectif de notre projet est d'évaluer l'effet thérapeutique potentiel de petits composés anti-prions susceptibles de prévenir l'agrégation de l'IAPP dans les cellules β du pancréas.

Le ralentissement ou l'arrêt de la propagation du repliement pathogénique de l'hiAPP permettra de réduire la mort des cellules β qui produisent l'insuline et ainsi d'éviter l'hyperglycémie. Ce traitement préventif aura pour conséquence de stabiliser le DT2, de réduire le risque lié à l'hyperglycémie chronique et d'améliorer le confort de vie des patients. Pour des patients pré-diabétiques ou intolérants au glucose, une prévention de la mort des cellules β pourra freiner ou empêcher la survenue d'un DT2.

Afin d'atteindre notre objectif, nous avons besoin d'utiliser des agrégats natifs d'hiAPP. Dans cette demande d'autorisation de projet, nous souhaitons utiliser le pancréas de souris transgéniques RIPHAT. En effet, une étude récente a montré que l'agrégation de la protéine humaine IAPP (hiAPP) peut être reproduite dans des cellules β de pancréas de rat en culture par ensemencement avec des agrégats d'IAPP issus de broyats de pancréas de souris mâles transgéniques RIPHAT sur-exprimant l'IAPP humaine. En effet, seuls les animaux transgéniques mâles homozygotes développent un DT2 avec une agrégation d'IAPP sous forme de fibres amyloïdes dans les cellules β pancréatiques. Le pancréas des souris mâles RIPHAT est un élément central de notre projet car il est la source des agrégats amyloïdes d'hiAPP endogènes qui sont nécessaires à nos tests cellulaires de l'effet des molécules anti-prions. Les mâles homozygotes pour le transgène hiAPP seront obtenus par le croisement d'animaux hétérozygotes. Les souriceaux issus de ces croisements seront génotypés (procédure 1) et une goutte de sang sera prélevée 1 fois par semaine à partir de l'âge de 20 semaines pour suivre leur glycémie (procédure 2). L'état de ces animaux sera suivi régulièrement (procédure 3).

Les protocoles de ce projet répondent aux exigences des 3R. Concernant le Remplacement, ce projet ne peut pas être mené *in vitro* car il n'existe pas de type cellulaire β produisant spontanément des agrégats d'IAPP. Concernant la Réduction du nombre d'animaux utilisés dans cette étude, il sera adapté au plus juste afin de préparer les homogénats de pancréas à partir de souris mâles. La lignée sera maintenue avec un nombre d'animaux minimum hétérozygotes qui ne développent un DT2 léger qu'après 12 mois. Nous prévoyons d'utiliser environ 20-25 mâles homozygotes par an et environ 10-12 couples hétérozygotes pour le maintien de la lignée, soit un total de 200-245 animaux pour 5 ans. Concernant le Raffinement, les souris seront hébergées en cages 1284L réglementaires, avec de la cellulose et équipées d'igloos pour l'enrichissement au milieu et leur état de santé sera régulièrement surveillé afin de ne pas les laisser développer de DT2.

11178 Les infections du système digestif par des parasites représentent un problème de santé mondial. A ce titre, la compréhension des mécanismes régissant l'immunité des muqueuses est une question majeure que nous nous proposons d'explorer dans ce projet. Notre équipe vient de mettre en évidence que certaines cellules épithéliales de l'intestin, les cellules tuft, sont impliquées dans la réponse immunitaire mise en jeu lors d'infection parasitaire et d'allergie (aussi appelée réponse de type 2). Bien que nos données démontrent que les cellules tuft initient cette réponse immune, il est fortement envisageable que ces mêmes cellules aient aussi un rôle effecteur dans ce processus. Ce projet sera mené selon les modalités du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». (1) Aucun modèle d'infection parasitaire *in vitro* n'étant disponible à ce jour, nous utiliserons une lignée de souris transgénique pour tester l'hypothèse selon laquelle l'acétylcholine produite par les cellules tuft est capable de cibler les parasites. (2) L'élevage des animaux se fera dans un milieu enrichi (maisonnette, carrés

de cellulose) sous la supervision de personnels qualifiés des animaleries. Les animaux feront l'objet d'un suivi scrupuleux permettant d'anticiper l'atteinte des points limites, et seront manipulés sous anesthésie lors des phases expérimentales. (3) Le nombre d'animaux requis pour ce projet a été défini selon une approche statistique rigoureuse permettant d'atteindre nos objectifs scientifiques. De plus, nous utiliserons des animaux des deux sexes sans a priori, ceci permettant de réduire le nombre d'individus à produire. Nous utiliserons une lignée transgénique, soit un total d'animaux estimé à 80 individus, sur une durée totale de projet de 2 années.

11179 Malgré les progrès médicaux, les maladies cardiovasculaires sont, avec les cancers, la principale cause de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés (environ 150 000 morts par an en France). Les maladies cardiovasculaires ont principalement pour origine l'atteinte ischémique (manque d'oxygène) du myocarde et l'hypertension artérielle.

L'infarctus du myocarde est déclenché par l'obstruction d'une artère qui alimente le cœur en sang et donc en oxygène (artère coronaire). Privées d'oxygène, les cellules musculaires du cœur meurent rapidement sur une zone plus ou moins étendue. Cela entraîne des problèmes de contraction du muscle cardiaque (myocarde), se manifestant notamment par des troubles du rythme. L'évolution au long court est le développement de l'insuffisance cardiaque ; le cœur n'est plus capable d'assurer la perfusion des tissus et le taux de mortalité atteint 50 % à 4 ans.

L'infarctus du myocarde avec une extension au ventricule droit est une pathologie fréquente, souvent mal diagnostiquée, alors qu'il présente des complications nombreuses. Le diagnostic et la thérapeutique qui sont adaptés à cet infarctus sont mal connus.

L'insuffisance cardiaque du ventricule droit est l'étape terminale d'un long remodelage silencieux du cœur droit caractérisé par l'hypertrophie, la fibrose et la dilatation ventriculaire droite se compliquant dans les dernières étapes d'une insuffisance cardiaque gauche.

La recherche dans ce domaine reste donc un enjeu majeur de santé publique. Malgré les avancées récentes dans le diagnostic et la prise en charge de l'insuffisance cardiaque, la prévalence et l'incidence de cette pathologie ne cessent d'augmenter.

Les objectifs de recherche sont de trouver de nouvelles cibles diagnostiques et thérapeutiques pour contrer les acteurs moléculaires délétères de l'insuffisance cardiaque droite et de ses conséquences.

Dans ce cadre, nous utilisons des modèles murins permettant de rechercher et de tester l'implication physiopathologique des protéines ciblées.

Cette approche permet de tester plus rapidement des hypothèses sur la pertinence de la cible en l'absence d'outils pharmacologiques. Les différentes étiologies humaines de l'insuffisance cardiaque peuvent être reproduites chez l'animal par des interventions chirurgicales.

Réduction : Lors des études et dans un souci de réduction, chaque animal est utilisé pour mesurer plusieurs caractéristiques (physiologiques, anatomiques, histologiques, biochimiques et moléculaires) du développement de la pathologie. De plus, afin de limiter le nombre d'animaux nous utilisons l'imagerie photoacoustique qui est une technologie multimodale combinant les avantages des ultrasons (résolution) et de l'imagerie photonique (sensibilité).

Cela permet de fournir des données anatomiques, fonctionnelles et moléculaires *in vivo*, non invasive, en temps réel, permettant un suivi longitudinal de l'animal où chaque individu est son propre contrôle et ce sans irradiation. Compte tenu de la variabilité de ces mesures, pour chaque cible testée et pour chaque modèle, moins d'une vingtaine de souris sont utilisées par groupe. Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet sera estimé à 156. Nous travaillons ainsi sur plusieurs cibles potentielles de diagnostics et de traitements futurs de l'insuffisance cardiaque.

Raffinement : L'intervention chirurgicale, qui vise à reproduire chez l'animal l'infarctus du myocarde tel qu'il est observé en clinique, est réalisée sous anesthésie et analgésie pré et post opératoire. Pour améliorer le quotidien des souris ayant ou non un phénotype dommageable, des matériaux de litière ou des structures de repos adaptés sont installés dans les cages (mouchoir en papier, rouleau en carton...).

Nous respectons la règle des 3R pour cette étude :

Remplacement : Malgré leurs caractères délétères, ces interventions sont nécessaires pour reproduire dans un système intégré, l'animal, les différentes composantes de la pathologie humaine. Il n'existe actuellement aucune méthode (*in vitro* ou *in silico*) permettant de découvrir et de suivre l'évolution de biomarqueurs et/ou de cibles thérapeutiques aux cours du développement de l'insuffisance cardiaque. Notre approche expérimentale est un gage d'une meilleure transposition vers la clinique dont le besoin de nouveaux traitements est urgent.

11180 Notre sujet de recherche est focalisé vers l'étude de physiopathologie des maladies neuro-développementales d'origine génétique chez l'homme. Nous et nos collaborateurs avons identifié de nombreux gènes impliqués dans ces maladies. L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les rôles d'un de ces gènes dans les processus développementaux du système nerveux central et ainsi d'améliorer notre compréhension des mécanismes soutenant l'apparition de ces maladies chez l'homme. Nous avons déjà identifié des altérations dans les processus de prolifération des progéniteurs neuronaux, la migration et la différenciation des cellules neuronales au cours du développement, grâce à la technique d'électroporation *in utero* permettant de modifier l'expression ou la fonction des protéines étudiées.

Nous souhaitons à présent poursuivre ces travaux et étudier l'effet des mutations dans un contexte physiologique, qui est celui des mutations hétérozygotes observées chez patients. Nous étudierons les conséquences sur le développement cortical et au stade adulte sur le plan comportemental et sur le plan histologique. Cela permettra de mieux comprendre le lien entre les altérations cellulaires que nous avons observées et le phénotype des patients chez lesquels les mutations ont été identifiées, à savoir une altération de l'organisation du cortex, accompagnée de retard mental et d'épilepsie.

Pour cela nous avons généré dans le cadre d'un programme européen des nouveaux modèles murin à l'image du génotype de nos patients dans l'optique de générer un bon modèle pour étudier la physiopathologie de ces maladies neurodéveloppementales.

REMPACEMENT : Pour ce projet nous utiliserons le modèle souris car les processus étudiés (développement, histologie du cortex, comportement) ne peuvent être observés que sur un organisme vivant et ne peuvent pas être recréés par des approches *in vitro*.

RAFFINEMENT : Les études histologiques au cours du développement embryonnaire et à l'âge adulte n'entraînent pas de stress ou de souffrance pour l'animal. Concernant les tests de comportement, les animaux seront suivis et s'ils présentent des signes de douleur seront euthanasiés. Les animaux feront l'objet d'un suivi permettant de s'assurer de leur santé et leur bien-être.

REDUCTION : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés nous utiliserons les mêmes souris pour les études du comportement et histologiques. Les études se feront sur le modèle murin développé et sur des souris sauvages, contrôles. Le nombre total de souris utilisées est de 120 souris maximum : 20 souris par génotype (6 génotypes - trois modèles et trois contrôles), de sexe mâle, pour la caractérisation comportementale et histologique afin d'obtenir une puissance statistique suffisante (ANOVA avec comparaisons multiples de Tukey).

11181 Des données dans la littérature montrent que le microbiote (microbes) intestinal joue un rôle dans la maturation du fonctionnement cérébral en particulier en cas de stress. Ceci a été montré chez des rongeurs axéniques (dépourvus de microbes) pour lesquels un stress de nouveauté augmente les taux des hormones du stress et de certains transmetteurs dans des régions cérébrales.

Ce projet vise à décrire les structures cérébrales dont l'activité est modifiée lors d'un stress de nouveauté chez le rat axénique comparé à des rats conventionnels (pourvus de microbes) par imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (méthodologie non invasive) afin de confirmer les liens qui existent entre le microbiote et le cerveau.

Des rats Fischer axéniques et conventionnels recevront par voie intrapéritonéale du manganèse (agent de contraste, 30 mG/kG) puis seront placés dans une enceinte nouvelle pendant 6 min

(stress de nouveauté), Ils seront ensuite anesthésiés (isoflurane 2 à 3 %) et l'activité de leur cerveau sera analysée par imagerie par résonance magnétique fonctionnelle. A la fin de l'expérience, les rats seront euthanasiés et le cerveau et le sang seront prélevés pour des analyses biochimiques. Il n'existe pas de méthodes alternatives pour réaliser ce travail tant il s'agit d'étudier des interactions complexes au sein de l'hôte et le nombre de rats (20) se justifie par les analyses effectuées qui nécessitent un minimum d'animaux pour être statistiquement exploitables. Les rats proviennent d'élevages reconnus et sont nés en captivité. La souffrance et l'angoisse des rats seront réduites au maximum et un suivi quotidien permettra de réagir de façon adéquate en cas de besoin.

La technique utilisée, MEMRI pour Manganese Enhanced Magnetic Resonance Imaging, est particulièrement bien adaptée à la mise en évidence de régions cérébrales spécifiques à une stimulation. La force de la méthode repose sur le fait que l'activation peut être fait sur animal éveillé, ce qui est indispensable pour cette étude sur le stress. Les zones activées sont marquées par le Manganèse, qui agit comme un analogue du calcium, pendant la stimulation. Ces zones sont ensuite révélées par IRM. Pour ce faire, nous disposons de l'appareil le mieux adapté du marché à l'IRM cérébral chez le rat. La combinaison du MEMRI, de cet outil de choix, mais aussi de notre expérience dans le domaine, nous permettra de réaliser l'expérience idéale pour la mise en évidence de différences d'activations cérébrales aux stress chez des rats axéniques ou normaux.

11182 Les tumeurs du cerveau sont incurables (5000 cas par an en France). Ces tumeurs du cerveau sont classifiées selon le type de tumeurs du cerveau et selon le grade de la maladie. Une tumeur de bas grade engendre un meilleur pronostic vital qu'une tumeur de haut grade. Cela signifie par exemple que le taux de survie à 2 ans est plus important avec une tumeur de bas grade qu'avec une tumeur de haut grade.

Le type de tumeur du cerveau est également un facteur de pronostic vital. Il existe plusieurs types de cancers du cerveau, dont les principaux sont classifiés comme suit : (1) tumeurs de type gliales, (2) tumeurs de type astrocytaire, (3) tumeur de type Oligodendrogliome, (4) tumeur de type glioblastome, (5) tumeur de type lymphome. A titre d'information, le glioblastome est le cancer du cerveau avec le moins bon pronostic vital.

La prise en charge du cancer du cerveau passe généralement par une chirurgie suivie d'une radiothérapie couplée à la chimiothérapie. Pour autant, le pronostic vital reste faible à ce jour.

Ce faible pronostic vital s'explique par la difficulté des médicaments à entrer dans le cerveau et part le fait que les cancers du cerveau contiennent une sous population de cellules hautement tumorigènes. Ces cellules souches humaines résistent plus que d'autres types cellulaires aux traitements cytotoxiques. Ainsi, des nouvelles approches permettant à la fois d'augmenter l'accessibilité des médicaments au cerveau et des traitements permettant d'éradiquer les cellules souches sont activement recherchées pour un traitement plus efficace des cancers. La difficulté réside dans le fait que le cerveau est doté d'une barrière hémato encéphalique (BHE). La BHE joue un rôle fondamental dans l'homéostasie du liquide interstitiel dans lequel baignent les neurones, en isolant le cerveau du reste de l'organisme. Elle régule ainsi les échanges entre le sang et le cerveau. Du fait de ses particularités anatomiques (jonctions serrées...), elle limite les phénomènes de diffusion non spécifiques à travers l'endothélium cérébral et limite donc considérablement l'entrée des médicaments dans le cerveau.

Afin de pouvoir prédire si un médicament peut atteindre sa cible tumorale pour des pathologies du cancer du cerveau, une solution de choix serait d'évaluer chez l'animal la perméabilité de la BHE avec différents types de tumeurs à l'aide modèles animaux validés.

Le projet consiste à valider cinq (5) modèles animaux de tumeurs cérébrales et de déterminer pour chacun la perméabilité de cette barrière à l'aide de molécules de références. Pour cela, les cellules cancéreuses humaines seront xéno-gréffées à des souris puis des molécules de références seront administrées aux souris. Par la suite, ces molécules de références seront dosées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Les modèles animaux une fois validés permettront de tester les candidats médicaments retenus lors du criblage in-vitro.

Ces modèles animaux présenteront une valeur prédictive élevée quant à l'évaluation de la biodisponibilité cérébrale de nouvelles molécules thérapeutiques pour l'homme, correspondant à leur capacité de diffusion à travers la BHE selon le type et le grade du cancer du cerveau.

A l'issue de ce projet, nous pourrions proposer des modèles animaux originaux et validés ; de BHE humaine adaptée aux tests de candidats médicaments retenus.

Notre laboratoire développe et valide des modèles cellulaires de barrière hémato-encéphalique (BHE) animales (rat, souris, primate non humain). Ces modèles associent deux types de cellules primaires : des cellules endothéliales microvasculaires, cultivées sur une membrane semi-perméable, et des cellules gliales (seul ou en présence de cellules tumorales). Ces modèles présentent certaines caractéristiques de la BHE *in vivo*. Ce modèle *in-vitro* permet lors d'une première phase de screening de mieux prédire l'entrée des candidats médicaments dans le cerveau et donc de sélectionner les meilleurs candidats médicaments.

Pour autant un modèle animal est indispensable afin de valider les candidats médicaments retenus lors de la démonstration d'une preuve de concepts *in-vivo*.

Cette expérimentation répond aux exigences en termes de réduction, de remplacement et de raffinement. Nous avons calculé qu'un nombre maximum de 320 souris permet une analyse statistiquement valable des résultats que nous obtiendrons. Enfin, le raffinement des animaux est assuré, durant l'élevage, par le suivi quotidien des animaux par un personnel qualifié et compétent et la constitution de groupes sociaux d'animaux. Les animaux seront hébergés en groupe dans une cage enrichie avec des accessoires de jeu et du matériel pour la fabrication de nids. Des critères d'arrêt d'expérimentation ont été réfléchis et seront appliqués afin d'empêcher toute souffrance animale.

11183 Le système nerveux est un système biologique animal responsable de la coordination des actions avec l'environnement extérieur et de la communication rapide entre les différentes parties du corps. À l'échelle cellulaire, le système nerveux est défini par la présence de cellules hautement spécialisées appelées neurones, qui ont la capacité, très particulière, de véhiculer un signal électrochimique. Notre projet se focalise principalement sur le cortex cérébral qui joue un rôle clé dans la mémoire, la pensée, le langage et la conscience. Au cours du développement, les neurones du cortex doivent migrer sur de très longues distances avant pouvoir rejoindre leur destination finale et se connecter avec d'autres neurones. La migration de ces neurones et l'établissement de connexions entre neurones sont essentielles pour le bon fonctionnement de notre cerveau, et dépendent de l'expression de plusieurs gènes. Les études génétiques ont identifié plusieurs gènes candidats associés à des malformations du développement du cortex cérébral. Notre projet vise donc à étudier les mécanismes majeurs à la base du développement du système nerveux en posant des questions clés sur la façon dont le cortex s'organise pendant la vie embryonnaire. Nous utilisons la souris comme modèle du développement du cortex cérébral pour mieux comprendre les mécanismes à la base des troubles du développement chez l'humain. Nous travaillons principalement sur le gène COUP-TFI, appelé aussi NR2F1 chez l'humain, qui a été trouvé muté chez plusieurs patients donnant naissance à des troubles cognitifs. Ce gène est exprimé à des stades spécifiques au cours du développement et agit dans des régions et populations distinctes du cortex cérébral. Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons comparer des souris génétiquement modifiées (constitutives et conditionnelles) pour ce gène avec des souris contrôles à divers stades de développement pré- et postnatales et suivre dans l'espace et le temps les types cellulaires impliqués. Nous prévoyons aussi d'étudier le comportement de ces souris pour mieux discerner les troubles cognitifs des patients.

Nos procédures expérimentales incluent la fixation du tissu cérébral par perfusion intracardiaque pour bien préserver les neurones, l'injection de traceurs (fluorochromes) par stéréotaxie pour suivre la connectivité axonale des différentes populations neuronales, et l'électroporation *in utero*, pour modifier l'expression des gènes dans des zones ciblées du cortex en développement. Notre projet inclut également l'injection de nucléotides modifiés pour suivre la multiplication cellulaire *in vivo*, l'élevage d'animaux avec des légers troubles de comportement à l'âge adulte et des tests de comportement sur deux lignées de souris mutantes pour COUP-TFI. Nous utiliserons des

techniques d'analyse histologique post mortem, des immunomarquages et de la détection d'ARN (hybridation *in situ*) pour suivre la distribution des types cellulaires, la migration cellulaire et leurs projections. Notre étude est basée sur une caractérisation des souris génétiquement mutantes combinée aussi à des approches *ex vivo*, comme le transfert de gènes et l'enregistrement de l'activité neuronale dans des cultures organotypiques de tissus prélevés post mortem, qui nous permettrons de tester directement les conséquences fonctionnelles des altérations du développement induit et des gènes transférés.

Vue que ces gènes agissent principalement au cours du développement du système nerveux, et afin d'éviter une possible souffrance associée à leur absence dans les adultes, une grande partie de notre étude se limite chez l'embryon précoce et aux stades périnataux. En accord avec la règle des 3Rs, la qualité de la contention et la sûreté des gestes seront assurés par des utilisateurs compétents et formés, ce qui limitera le stress et la douleur imposés à l'animal par les procédures. Comme mesures de Raffinement de l'expérimentation, les procédures sont mises en œuvre en utilisant systématiquement des critères d'arrêt précoce et des points limites adaptés à chaque procédure et modèle génétique. Les procédures qui impliquent de la chirurgie sont mises en œuvre en utilisant systématiquement des traitements post-opératoires de type analgésique et des critères d'arrêt précoce qui minimisent la douleur et la détresse des animaux. Le bon état ou la souffrance des animaux seront observés selon des grilles d'évaluations indiquées en Annexes. Les animaux seront hébergés dans les conditions habituelles d'animalerie avec un environnement enrichi, sans isolement et en accord avec la réglementation en vigueur. L'association des techniques d'études sur organes *ex vivo* et des cultures cellulaires *in vitro* nous permet de remplacer autant que possible les expériences sur animaux vivants (Remplacement). Dans un souci de Réduction, le nombre d'animaux pour chaque expérience sera limité à celui nécessaire à la validation d'un effet significatif. Nous utilisons une stratégie de croisement qui permet d'utiliser tous les animaux générés, et les mêmes animaux seront utilisés à la fois pour les études anatomiques, moléculaires et comportementales. Le génotypage des souriceaux permettra de sélectionner les souris et de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les différentes procédures. En outre, la technique d'électroporation *in utero* nous permet de réduire l'éventuelle importation d'autres lignées transgéniques, en obtenant des données suffisantes pour répondre à nos questions scientifiques et sans compromettre le bien-être animal. Pour ce projet nous utiliserons un nombre total de 3630 animaux (1080 adultes ; 340 P21 ; 420 P14 ; 1790 souriceaux entre P0 et P7).

11184 La transplantation d'îlots pancréatiques constitue aujourd'hui une alternative à l'insulinothérapie chez le patient diabétique de type 1. Cependant, le manque de donneurs, ainsi que le recours aux immunosuppresseurs limitent le succès à long terme et le déploiement à grande échelle de cette thérapeutique. C'est pour dépasser ces limites que des dispositifs d'encapsulation, appelés pancréas bioartificiels, ont été mis au point. Parmi eux, notre dispositif permet d'encapsuler des cellules sécrétrices d'insuline, à l'aide de membranes sélectives qui sont imperméables aux molécules impliquées dans le rejet mais perméables au glucose, à l'insuline, à l'oxygène et aux nutriments. Ainsi, aucun traitement immunosuppresseur ne sera nécessaire et l'utilisation de différents types de cellules pourra être envisagée.

Des premiers tests de fonction du dispositif ont déjà été réalisés *in vivo* et ont conduit à des modifications de différents composants du dispositif : membranes, traitement de surface, traitement du support permettant la répartition des cellules dans le dispositif, système de raccordement. Ces différents changements dans la conception du dispositif permettent aujourd'hui de disposer de la version finale, destinée à être implantée chez le patient lors des futurs essais cliniques. La première étape consistera donc en des tests *in vitro*, de toxicité des différents composants avec des cultures d'îlots pancréatiques de rats, après un temps de contact de 48h dans le milieu de culture adapté. Cela permettra de vérifier que les différents composants n'affectent ni la viabilité des îlots de rat, ni leur capacité à sécréter de l'insuline en réponse à une stimulation au glucose. Si les résultats de ces tests *in vitro* sont positifs, il s'agira dans un second temps de déterminer la biofonctionnalité du dispositif implanté chez le rat diabétique, et remplis avec des îlots de rats ou des cellules à insuline d'origine humaine. Les résultats attendus de ce protocole devraient nous permettre de valider

l'efficacité de la version finale du dispositif chez le petit animal, que ce soit avec une greffe allogénique (îlots de rats vers le rat) ou xenogénique (cellules d'origine humaine vers le rat). De plus, cela permettra de préparer au mieux les études sur le gros animal (porc ou primates) et ainsi limiter le nombre d'individus. Le choix d'isoler des îlots pancréatiques chez le rat est motivé par l'homogénéité des souches qui limitera la variabilité lors des tests de toxicité, ainsi que par le coût d'un isolement, bien plus faible que pour l'isolement d'îlots humains et porcins, également limités par le nombre d'organes disponibles. Pour les études de fonctionnalité, le même modèle a été choisi, permettant de réaliser des transplantations allogéniques. De plus, le rat a l'avantage d'avoir des caractéristiques physiologiques proches de l'Homme et de bien supporter les interventions chirurgicales. Ainsi, des dispositifs d'encapsulation seront implantés chez des rats mâles diabétiques pour une durée d'au moins un mois. Ce délai laisse à l'animal le temps de cicatriser et permet le développement de vaisseaux sanguins autour du dispositif. Une fois ce délai écoulé, des cellules sécrétrices d'insuline sont injectées dans le dispositif via des chambres implantables et des cathéters placés en sous-cutanée. Les cellules vont alors réguler de manière autonome et physiologique la glycémie de l'animal. Le dispositif implanté sera identique pour l'ensemble des groupes expérimentaux, mais différents types de cellules seront injectées : îlots pancréatiques de rat et trois types de cellules bêta dérivées de cellules souches humaines. Afin d'obtenir une meilleure régulation de la glycémie avant l'injection des cellules dans le dispositif, des pompes délivrant de l'insuline en continu sont implantées sous la peau des rats diabétiques, puis enlevées après l'injection des cellules. Le principe de réduction est ici appliqué en utilisant un nombre minimum d'animaux qui reste suffisant pour l'obtention de résultats statistiques. Pour chaque groupe expérimental, 15 rats diabétiques avec recevant notre dispositif rempli de cellules et 15 rats diabétiques recevant notre dispositif contenant du milieu seul seront utilisés pour chaque temps d'étude. Ces effectifs permettront d'obtenir suffisamment de données pour réaliser des analyses statistiques et valider l'étude. Au total, 360 rats diabétiques seront implantés, ce qui nécessite, au vu des 80% d'efficacité du modèle d'induction du diabète utilisé, l'emploi de 450 rats sains. L'obtention d'îlots pancréatiques de rat pour injection dans le dispositif implanté chez le rat diabétique nécessite l'utilisation de 6 pancréas pour un receveur soit un total de 270 animaux. Enfin, les tests de toxicité nécessiteront 15 rats par composant testé soit 60 animaux, portant le nombre total d'animaux nécessaires à 780. Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement : les animaux auront accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire.

11185 Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) maintiennent l'hématopoïèse (production des cellules sanguines) durant la vie entière d'un individu. Elles sont capables de former tous les types cellulaires du sang et sont localisées dans la moelle osseuse.

Au cours de sa vie, un individu est exposé de manière plus ou moins importante à des faibles doses de rayonnements ionisants (environnement, diagnostic, travail). Certains individus pourront également être exposés à des doses de rayonnement moyennes (radiothérapie) ou/et fortes (accident nucléaire). Les os et en particulier la moelle osseuse font partie des tissus les plus sensibles à une irradiation. Une atteinte des CSH peut entraîner des maladies graves comme l'anémie aplasique (manque de globules rouges) ou bien des cancers et donc devenir fatale chez l'individu irradié. Le microenvironnement de la moelle osseuse joue un rôle majeur dans la protection et l'intégrité du réservoir de cellules souches.

Les macrophages, présents dans la majorité des tissus de l'organisme, dont la moelle osseuse, sont des cellules immunitaires faisant partie du microenvironnement des CSH. Dans la littérature, des travaux ont montré que les macrophages de la moelle sont résistants à l'irradiation et semblent protéger les CSH de l'épuisement dans les situations de stress. Une partie de notre projet de recherche est de déterminer si les macrophages de la moelle ont un rôle protecteur dans le devenir des cellules souches après irradiation. Ceci pourrait ainsi permettre la prévention ou la modulation

des effets potentiellement néfastes engendrés sur les CSH lors d'une irradiation médicale (diagnostic, radiothérapie) ou accidentelle.

Deux modèles de souris sans macrophages seront utilisés afin de valider nos résultats : un modèle chimique (injection d'un produit entraînant l'élimination des macrophages) et un modèle constitutif (souris génétiquement modifiée, sans macrophages). Après une irradiation d'intensité variable, les souris seront euthanasiées et toutes les populations cellulaires de leur moelle osseuse seront analysées à court et long-termes pour évaluer l'atteinte des cellules souches en l'absence de macrophages environnants. La localisation et la fonctionnalité des cellules souches seront également étudiées.

Des travaux ont également décrit l'importance d'une autre population cellulaire (MUSE) présente dans le microenvironnement de la moelle osseuse. Ces cellules sont très bien caractérisées chez l'Homme. Elles ont les avantages majeurs de présenter un très faible risque tumorigène et de pouvoir être transplantées sans rejet chez des souris. La transplantation de seulement 20 000 cellules a permis leur migration et la reconstitution d'un foie ayant été endommagé.

Dans le cas d'une irradiation à forte dose, la moelle osseuse est très endommagée. Il est alors nécessaire d'effectuer une greffe de moelle osseuse d'un donneur compatible pour le rétablissement d'une hématopoïèse fonctionnelle. Sans greffe, l'individu irradié ne survivra pas. En thérapie chez l'Homme, il est nécessaire d'injecter un nombre considérable (plusieurs millions) de cellules de moelle pour être efficace.

Une autre partie de notre projet consiste donc à irradier des souris à forte dose, puis à les greffer avec ces cellules MUSE dans le but de reconstituer une hématopoïèse fonctionnelle. Nous testerons ainsi l'efficacité de cette population cellulaire dans la réparation d'une moelle osseuse lésée après irradiation. Ceci permettra d'améliorer la survie de patients ayant subi un traitement qui endommage leur moelle, tout en essayant de réduire la taille et la qualité du greffon à transplanter.

L'utilisation d'un modèle expérimental *in vivo* est essentielle à ce projet car on étudie la réponse globale de la moelle osseuse à une irradiation. La souris est un modèle de choix car elle reproduit assez fidèlement la physiopathologie humaine et il existe des modèles de souris transgéniques ou déficientes en certaines molécules qui permettent la réalisation de tests mécanistiques. L'ensemble de nos expériences est planifié pour pouvoir réaliser des tests statistiques et pouvoir réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans ce projet. Le nombre de souris nécessaire est estimé à 3291 sur 5 ans. Les conditions d'hébergement et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire tout stress et souffrance durable.

Les animaux sont hébergés dans l'animalerie de l'Institut, sous des conditions visant à leur apporter le maximum de bien-être et à satisfaire leurs besoins physiologiques et éthologiques. Toutes les greffes de moelle osseuse seront réalisées sous anesthésie générale. L'état clinique des souris sera évalué par une grille de score. Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire en charge de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou bien de décider l'euthanasie des animaux.

11186 Chez l'homme les maladies métaboliques telles que les dyslipidémies ou le diabète (types 1 et 2), sont à l'origine de nombreuses pathologies touchant le fonctionnement de différents organes comme le cœur, les vaisseaux, le foie ou encore les reins. Elles constituent des composantes majeures du syndrome métabolique dont la prévalence en France est estimée à 22% chez les hommes et 18% chez les femmes. Ce syndrome est reconnu comme un problème majeur de santé publique, et est associé à d'autres facteurs de risque comme l'hypertension ou encore l'obésité et l'insulino-résistance. Parmi les conséquences des maladies métaboliques, on retrouve les cardiopathies ischémiques ou le risque d'accident vasculaire cérébral, qui sont la conséquence du développement de lésions d'athérosclérose associée à de la thrombose conduisant à un rétrécissement voire une obstruction totale des artères, mais aussi la stéatose hépatique non alcoolique (NASH). Des interventions chirurgicales pour les pathologies ischémiques (angioplastie avec ou sans pose de stent, pontage) jusqu'à la greffe hépatique pour la NASH sont possibles pour soit revasculariser la zone ischémique soit pallier une insuffisance hépatique terminale. Cependant

le besoin thérapeutique pour réduire la survenue de ces pathologies d'origine métabolique reste important.

Ce projet décrit les procédures utilisées pour valider *in vivo* de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement des maladies métaboliques comme les dyslipidémies et le diabète (type 1 et 2), qui ont comme conséquence le développement de pathologies altérant le fonctionnement de différents organes tels que le cœur, les vaisseaux, le foie et les reins.

Dans ce domaine, la recherche de nouveaux traitements est initiée *in vitro*, sur des cellules d'intérêt (hépatocytes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses vasculaires, monocytes...) d'origine humaine ou animale. Elle a pour objectif de fournir des indications sur la manière dont les nouveaux produits agissent sur les mécanismes et les cibles impliqués. Cette étape *in vitro* permet de sélectionner les produits actifs. Cependant ces approches alternatives ne permettent pas d'étudier les processus survenant sur le long terme, ni ceux impliquant les régulations neuro-humorales uniquement présentes sur l'animal entier. En effet, les métabolismes lipidique et glucidique sont des processus complexes impliquant les fonctions hépatiques mais aussi les autres tissus utilisateurs des lipides. Ainsi seule une approche *in vivo* intégrée et pertinente peut nous permettre d'étudier les désordres métaboliques et leurs conséquences sur le système cardiovasculaire et hépatique.

Notre objectif est alors de tester chez le rongeur les candidats médicaments efficaces *in vitro* en utilisant des modèles animaux présentant des anomalies métaboliques (diabète, dyslipidémie) spontanées ou induites par transgénèse, transfection virale/non-viral, administration de toxines (CCl4, STZ), associées ou non à la mise sous régimes alimentaires spécifiques afin de s'approcher au mieux de la situation clinique du syndrome métabolique. L'efficacité des traitements sera évaluée en préventif et/ou curatif sur l'évolution longitudinale des paramètres physiopathologiques altérés dans le cadre des maladies métaboliques comme par exemple les taux de lipides sanguins, l'inflammation, la fibrose tissulaire (cœur, foie, rein...), les lésions d'athérosclérose ou encore les lésions hépatiques (stéatose notamment).

La coordination entre toutes les spécialités impliquées dans les études (modélisation *in silico*, pharmacocinétique, formulation, biochimie...) permettra de définir pour chaque nouveau candidat médicament des protocoles optimisés afin de réduire le nombre d'études *in vivo*.

Des biostatisticiens apporteront aux expérimentateurs leur support pour l'élaboration du design expérimental, pour optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études (en fonction de leur objectif, leur design, de la variabilité des paramètres mesurés, de la taille des effets à mettre en évidence et de l'historique des données) et pour effectuer ou revoir les analyses statistiques.

Les procédures décrites dans ce projet sont validées par le comité d'éthique. Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes et européennes, intégrant tous les aspects relatifs à l'utilisation des animaux (origine, hébergement, soins, manipulation, expérimentations) et la prévention de la douleur et du stress. Tous les expérimentateurs ont suivi les formations réglementaires nécessaires à la pratique de l'expérimentation animale. Ils sont ainsi formés aux gestes impliquant la manipulation des animaux, l'observation des signes cliniques et à la chirurgie. Des critères d'alarme spécifiques ont été clairement identifiés comme la prostration et la perte de poids (notamment lors de l'utilisation de CCl4).

Le nombre maximal d'animaux qui devraient être utilisés dans le cadre de ce projet est de 2040 rats et 8160 souris sur 5 ans.

11187 La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative héréditaire caractérisée par des désordres moteurs apparaissant progressivement, un déclin cognitif et des troubles psychiatriques. La progression de la maladie est associée à une perte importante de neurones dans le cerveau. Les patients meurent habituellement 15 à 20 ans après l'apparition des premiers symptômes. En France, 12.000 patients sont touchés et environ 6.000 personnes développeront la maladie dans les 20 prochaines années. Actuellement, il n'y a aucun traitement efficace pour prévenir ou retarder l'apparition et la progression de cette pathologie.

Le but du projet est de tester de nouveaux médicaments permettant de retarder la progression de la maladie, ou d'empêcher l'apparition des symptômes. Nous avons récemment mis en place un outil nous permettant de tester ces médicaments sur des cellules et de valider l'effet bénéfique de ces médicaments sur celle-ci. Ces résultats prometteurs nécessitent désormais une validation sur des animaux en vue de proposer des médicaments aux nombreux patients atteints par cette maladie.

La souris apparaît comme le modèle de choix pour ce projet compte-tenu de la similarité de son cerveau avec celle de l'Homme et de l'existence chez cette espèce des outils de transgénèse nécessaires. Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude (5 procédures expérimentales) est de 1229. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Notamment, dès que possible, l'animal sera utilisé comme son propre contrôle afin de diminuer le nombre de groupes expérimentaux nécessaires. Ce projet implique de la neurochirurgie correspondant à un niveau de douleur de classe modérée. La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à des grilles codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance apparaissent.

Le projet traitant de réseaux neuronaux complet et nécessitant des approches comportementales, il nous est impossible de remplacer le modèle animal vivant par des cultures cellulaires ou des simulations informatiques.

11188 Des anomalies du métabolisme du fer sont fréquemment observées dans des pathologies métaboliques telles que l'obésité, le diabète ou l'anorexie. L'adaptation de l'homéostasie du fer à l'état nutritionnel et métabolique de l'organisme est très peu connue. En 2014, un nouveau facteur de régulation de l'hormone régulatrice du métabolisme du fer, l'hepcidine, a été mis en évidence. Cette protéine appelée érythroferrone ou Fam132b est produite par la moelle osseuse pour inhiber la production d'hepcidine au niveau du foie. Or Fam132b était connu auparavant pour être une myokine impliquée dans le métabolisme lipidique, dont l'expression est sensible à l'état nutritionnel. L'objectif de ce travail est d'étudier le rôle de Fam132b comme élément régulateur de l'hepcidine en fonction des conditions nutritionnelles de l'organisme. La compréhension de cette voie de régulation permettrait d'envisager des applications thérapeutiques aux anomalies secondaires liées au fer, telles que l'anémie de l'obésité, le syndrome métabolique avec hyperferritinémie, ainsi que l'anémie chronique du sportif de haut niveau. Il s'agirait alors d'activer ou inhiber la production de Fam132b en fonction du déséquilibre observé.

Pour cela différents stimuli nutritionnels tels que des régimes riches en graisse, des épreuves de jeûne et de rupture de jeûne, ainsi que des tests de tolérance au glucose vont être appliqués sur des souris wild-type ainsi que des souris KO pour ce facteur Fam132b. Les modèles murins Fam132b KO ne présente pas de phénotype à l'état basal. Par ailleurs les différentes expérimentations menées ne sont en aucun cas dommageable pour les souris (procédures de sévérité légère à modérée).

Ce projet nécessite un total de 360 souris et sera mené sur une durée 5 ans. La démarche scientifique a été établie afin de respecter la règle des 3R : 1- Réduction : Toutes les expérimentations réalisées utiliseront le nombre d'animaux minimum de façon à tirer des conclusions statistiquement fiables. Les groupes seront comparés par des tests non paramétriques de type Mann-Whitney (comparaison de deux groupes), ou Kruskal-Wallis (comparaison de plus de deux groupes). Un effectif de 10 souris par groupe a été estimé nécessaire afin d'obtenir suffisamment de puissance dans ce type de comparaison. Par ailleurs, au moment de l'euthanasie des organes seront prélevés pour être analysés dans le cadre de ce projet mais également pour des projets en collaboration utilisant la lignée Fam132b. 2- Remplacement : Les mécanismes étudiés reposent sur des interactions entre organes au sein d'un système intégré, impliquant de recourir à l'animal. En effet, l'hepcidine est produite essentiellement par le foie alors que Fam132b est sécrété par la moelle osseuse ou le muscle selon les conditions physiopathologiques. Des

expériences en culture cellulaire permettront de préciser les interactions entre les types cellulaires, en complément des expériences sur l'animal qui sont indispensables. 3- Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place des conditions maximales pour éviter l'inconfort et la douleur des souris. Les signes du comportement (excitation ou dépression, essoufflement, posture, apathie, réaction agressive, indifférence totale à l'environnement) seront les critères de points limites, à partir desquels la souris sera euthanasiée. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification afin de favoriser leur bien-être. Il est prévu d'euthanasier les souris en fin de projet.

11189 Les allergies alimentaires sont un problème majeur de santé publique. Elles correspondent à des réponses immunitaires inappropriées et excessives, induites contre des protéines alimentaires inoffensives. Outre leur prévalence élevée et leurs symptômes parfois graves, les allergies alimentaires affectent significativement la qualité de vie des patients. Elles ont un coût économique élevé, dû notamment à l'achat d'aliments hypoallergéniques ou non-allergéniques. Ainsi, les nourrissons à risque (dont l'un des parents est allergique) reçoivent généralement des laits maternisés à base de protéines de lait de vache partiellement digérées ou hydrolysées (pour une meilleure absorption des nutriments et une diminution du risque allergénique). Pour les nourrissons déjà allergiques au lait de vache, des hydrolysats plus poussés de protéines voire, si cette formule n'est pas tolérée, des laits maternisés à base d'acides aminés sont prescrits afin de prévenir tout risque de réaction allergique. Cette pratique de prévention assure une courbe de croissance satisfaisante aux nourrissons. Néanmoins, elle va à l'encontre de certaines études démontrant le rôle important des protéines alimentaires dans la maturation du système immunitaire. En effet, leur introduction à partir du sevrage puis lors de la diversification alimentaire est un facteur important de stimulation du système immunitaire. Cependant, le rôle de leur forme et de leur diversité dans la maturation du système immunitaire intestinal reste encore peu étudié.

L'objectif de l'étude est de mettre en évidence l'importance de la stimulation par les protéines alimentaires chez le nourrisson en testant différents régimes de sevrage. Nous allons ainsi mesurer, dans un modèle murin, l'impact de différentes sources protéiques (intactes, plus ou moins hydrolysées, agrégées par un traitement thermique) sur la maturation du système immunitaire de l'hôte, la mise en place et la fonction de la flore intestinale, et finalement sur le développement plus tard d'une allergie alimentaire ou l'induction d'une tolérance orale.

La digestibilité et le devenir des différentes sources protéiques dans le tube digestif seront évalués sur des modèles alternatifs *in vitro* mimant le tube digestif du nouveau-né, limitant ainsi le nombre d'animaux en expérimentation. Toutefois, aucun modèle *in vitro* n'est disponible pour évaluer l'impact de ces sources protéiques sur la maturation du système immunitaire de l'hôte, la mise en place de la flore intestinale et sur le développement ultérieur d'une sensibilisation de type allergique. Cette étude nécessite l'utilisation d'un modèle animal permettant d'analyser de façon intégrative ces différents facteurs.

Le nombre de 400 rongeurs, utilisés au cours de 4 procédures expérimentales, avec 10 individus par lot, a été calculé pour obéir aux minima nécessaires à l'analyse des données à l'aide de tests statistiques non paramétriques et permettre ainsi l'exploitation et l'interprétation des résultats.

Les rongeurs sont hébergés en groupe pour respecter leur mode de vie et en présence de différents éléments d'enrichissement (sous la forme de sopalin et de cabane type boîte à œuf). Les méthodes expérimentales (utilisation de la voie orale pour l'induction de la sensibilisation allergique, prélèvement sanguin) ont été choisies pour limiter toute souffrance lors de leur mise en œuvre et elles ne provoquent pas d'atteinte de point limite pouvant nécessiter un arrêt de l'expérience. L'état de santé des animaux sera contrôlé très régulièrement par une équipe formée et soucieuse du bien-être animal tout au long de l'étude, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée à la moindre détection d'un signe de souffrance.

11190 Au cours de ces dernières décennies, l'augmentation des activités humaines a entraîné l'exposition des populations animales à des milliers de polluants. Parmi les milieux aquatiques d'eau douce, les

zones humides sont des écosystèmes complexes exposés à l'accumulation de xénobiotiques. Dans ces zones humides, un déclin dramatique des populations d'amphibiens a été observé au niveau mondial depuis les années 80. La multipollution engendrés par les perturbateurs endocriniens (PE), les composés pharmaceutiques, les pesticides..., en combinaison avec d'autres facteurs, semble jouer un rôle prépondérant dans ce phénomène comparant les amphibiens à des sentinelles environnementales. Cependant ce statut est aujourd'hui remis en cause par certains scientifiques qui pensent que les amphibiens ne sont pas plus sensibles à la pollution que d'autres espèces. Ainsi, le déclin des populations d'amphibiens a été imputé par de nombreux auteurs à d'autres facteurs comme la perte d'habitat ou encore l'émergence de nouvelles maladies. Tous ces polluants apparaissent alors comme des facteurs de second plan qui exacerbent l'effet des facteurs prépondérants. Dans ce contexte polémique, l'impact réel de ces polluants seuls ou en mélange sur les amphibiens doit être étudié plus en détail. Les polluants dont les PE sont des composés exogènes ayant la capacité de perturber les régulations hormonales. Chez les vertébrés, ils ont été massivement étudiés pour leur capacité à interférer avec le développement des organes reproducteurs et la différenciation sexuelle. Un grand nombre de publications démontre des perturbations du système reproducteur chez les amphibiens provenant de zones polluées. Cependant des études récentes suggèrent que les polluants peuvent également entraîner des désordres métaboliques. Une étude récente dans notre laboratoire a démontré que le benzo[a]pyrène (BaP) est capable d'induire d'importants désordres métaboliques chez le xénope tropicalis caractérisés par un phénotype d'insulino-résistance-like au niveau transcriptomique. Sur le long terme, de tels effets métaboliques peuvent conduire à une perturbation de l'énergie allouée à la reproduction et avoir un impact significatif dans le déclin des populations d'amphibiens. Dans ce contexte et compte tenu du fait que les polluants d'une façon générale semblent pouvoir agir à la fois comme perturbateurs des fonctions reproductive et métabolique, l'importance relative de ces deux phénomènes et leur synergie possible dans le déclin des populations d'amphibiens doivent être étudiées plus en détail.

Ce projet se propose de mesurer l'effet sur le métabolisme énergétique hépatique des grenouilles du genre *Pelophylax* de polluants liés à l'activité humaine contaminant les eaux de surfaces (molécule pharmaceutique, pesticide, insecticide). Le choix des grenouilles du genre *Pelophylax* s'explique par le fait que ce soit un modèle de réalité environnementale et qui est bien représenté au niveau Européen. Pour l'ensemble de cette étude 120 animaux (60 mâles et 60 femelles) seront utilisés. Cependant, après euthanasie des animaux, l'ensemble des organes seront prélevés. Pour cette procédure, seul le foie et le pancréas seront utilisés pour les études de transcriptomique, mais le fait de récupérer tous les autres organes nous garantira l'étude de l'impact des xénobiotiques sur l'ensemble de la physiologie de l'animal sans avoir à réexposer d'autres animaux. Les procédures expérimentales utilisées ne sont pas supposées entraîner de problèmes majeurs ou de douleurs aux animaux. Cependant, nous avons défini des points limites permettant ainsi d'exclure les animaux de nos protocoles le cas échéant. De façon systématique, les animaux sont soumis à une surveillance régulière afin de pouvoir détecter toute souffrance et interrompre immédiatement le protocole. En cas d'apparition d'un état douloureux (prostration..) ou d'inflammation cutanée importante, l'animal sera euthanasié.

11191 Le diagnostic de l'infection toxoplasmique chez l'homme repose essentiellement sur la recherche des anticorps (sérologie de la toxoplasmose). Toutefois certaines formes de toxoplasmose (toxoplasmose congénitale, toxoplasmose sévère du patient immunocompétent, toxoplasmose symptomatique du patient immunodéprimé) peuvent nécessiter l'isolement du parasite à partir de produits pathologiques (liquide amniotique, placenta, sang, liquide de lavage bronchiolo-alvéolaire.) afin d'établir un lien entre ses caractéristiques génétiques, sa virulence et la gravité de l'infection. La quantité d'ADN recueillie à partir des isolats est souvent faible et ne permet pas toujours la caractérisation génétique de la souche. Pour obtenir une quantité suffisante d'ADN, la souche doit être "amplifiée" avant congélation de plusieurs échantillons qui seront distribués aux chercheurs au niveau international à la demande. De plus, selon les principes d'une démarche qualité adéquate, il est nécessaire de vérifier, de temps en temps, la viabilité des souches congelées ou de reconstituer le nombre d'échantillons par souche lorsque le stock a diminué du fait de l'utilisation

par les chercheurs. L'amplification des souches, la vérification de la viabilité et la reconstitution des stocks passent par l'inoculation des souches à des souris qui développent des kystes dans le système nerveux. Après quelques semaines d'infection asymptomatique, les souris sont mises à mort et les kystes intracellulaires cérébraux sont récupérés et congelés.

Ce projet utilisera maximum 450 souris sur une durée totale de 5 ans.

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

Remplacer : La culture cellulaire est possible pour le toxoplasme mais elle ne permet pas d'atteindre un stade de développement parasitaire adéquat pour son étude. L'inoculation à la souris est la méthode de référence actuellement.

Réduire : Le nombre d'animaux indiqué par la nomenclature des actes de biologie médicale est de 6 souris par produit pathologique inoculé. Notre expérience nous a permis de réduire ce nombre à 3 pour obtenir une quantité suffisante de parasite.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau à volonté, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, lorsque la souche à entretenir est virulente, les animaux sont sous une surveillance accrue et sont traités avec des agents antiparasitaires qui limite l'infection générale à l'origine d'un état de santé dégradé des animaux mais n'affectent pas le développement des kystes cérébraux.

11192 L'Accident Vasculaire Cérébral (AVC) conduit fréquemment à la perte de neurones du cortex moteur qui forment le faisceau corticospinal (FCS), structure clé dans le contrôle du mouvement volontaire. L'AVC est de fait la première cause de handicap acquis à l'âge adulte, et un enjeu majeur de la santé publique. Les thérapies existantes reposent majoritairement sur l'augmentation de la plasticité cérébrale. Toutefois, l'efficacité limitée des traitements pharmacologiques et de la rééducation motrice soulignent la nécessité de développer des stratégies innovantes pour améliorer la régénération tissulaire après une lésion du cortex moteur.

Afin de mimer les effets délétères d'un AVC, nous avons mis au point un modèle basé sur l'injection ciblée d'une toxine qui crée une lésion cérébrale. Cela nous permettra d'évaluer l'efficacité d'une nouvelle stratégie thérapeutique à base de bioimplants (hydrogels et prothèses structurées) sur la récupération motrice chez l'animal. Le cœur du projet vise à créer une technologie générique pour améliorer la réparation tissulaire après une atteinte dans le système nerveux central. L'idée principale de ce travail est la mise au point d'un système implantable dans le cerveau, dont le but est de régénérer des fibres d'un faisceau corticospinal endommagé. Les objectifs sont 1/ de mettre à profit les potentialités régénératrices (neurogenèse) des cellules souches du cerveau adulte, en fournissant au sein de la lésion, un support structuré qui crée un microenvironnement plus permissif au recrutement et surtout à la survie de cellules souches endogènes ; 2/ de fournir des cellules neuronales et gliales adultes, qui peuvent aider la régénération au niveau de la lésion. Concrètement, nous implanterons au niveau de la lésion des biomatériaux combinés avec un hydrogel pour espérer recréer des fibres motrices fonctionnelles. Dans l'espoir d'augmenter encore la régénération tissulaire, nous cultiverons sur les implants des cellules adultes neuronales et gliales, issues de lignées cellulaires ou isolées à partir de l'intestin de l'animal, qui s'ajouteraient à la neurogenèse endogène pour recréer des fibres motrices. Un protocole similaire a déjà eu une autorisation sur le rat testant la greffe de cellules souches neuronales sur des implants en silicone. L'étape suivante prévoit l'autogreffe de cellules souches ou adultes neuronales et gliales isolées à partir de l'intestin de rats à travers procédure d'appendicectomie. Enfin, nous effectuerons un suivi *in vivo* de la greffe/implant par IRM. Pour se rapprocher de la pratique clinique, nous privilégions l'examen de l'intégrité du tissu cérébral par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) *in vivo*. Cette technique présente l'avantage d'être non invasive, et est indispensable pour suivre la dégénérescence des tissus lésés, déterminer le volume lésionnel, et suivre l'effet bénéfique potentiel d'une greffe sur l'architecture tissulaire. Les animaux seront évalués pré-lésion, à 24h, et 3 mois. Ils seront anesthésiés pendant toute la durée de l'examen pour assurer leur immobilité et

éviter un stress inutile. Un groupe d'animaux aura une imagerie TEP, qui est la seule technique non-invasive qui permet de savoir si les cellules greffées sont vivantes 3 mois après la greffe. A la fin du suivi comportemental et d'imagerie, les animaux seront euthanasiés et le tissu cérébral sera analysé par histologie. L'analyse caractérisera la perte de neurones et de fibres myélinisées, l'inflammation, et en particulier la nature du tissu reconstruit autour des implants. Dans le cadre d'une implantation de biomatériau + cellules adultes neuronales et gliales, la survie et la formation de nouveaux neurones seront analysées.

Le bénéfice de notre stratégie thérapeutique de bio-implants (avec ou sans cellules) sur la récupération fonctionnelle de la motricité doit être évaluée sur des animaux vivants. La force d'agrippement, et la motricité des animaux seront testés sur le long terme grâce à des tests appropriés, sur des animaux entraînés.

Ce protocole est invasif et nécessite de montrer son efficacité sur un ou deux modèles animaux avant d'être essayé chez l'homme. Le modèle utilisé sera le rat. En accord avec la règle « Réduire » des 3Rs, les données d'IRM de protocoles précédents seront exploitées, en particulier, les groupes contrôles. Nous prévoyons 140 animaux sur 5 ans.

Les rats sont hébergés dans un portoir ventilé, 2 ou 3 par cage, dans une pièce réservée aux rats et contenant un autre portoir. L'alimentation est donnée *ad libitum*, y compris pendant les phases d'entraînement et d'évaluation moteurs. Le suivi de l'état de santé général de l'animal est assuré par le personnel de zootechnie, les animaux sont pesés toutes les semaines et bénéficient de contrôles vétérinaires réguliers. Une attention minutieuse est apportée aux animaux opérés, qui sont monitorés quotidiennement par le personnel de zootechnie et les expérimentateurs munis de l'habilitation à l'expérimentation animale niveau Concepteur (observation de l'appétit, du poids corporel, de la mobilité, de l'état du pelage et du comportement).

11193 Le diabète de type 2 (DT2) est reconnu comme un état inflammatoire de bas grade. L'inflammation exerce des effets délétères aussi bien au niveau pancréatique, en altérant la fonctionnalité et la survie des îlots de Langerhans, mais aussi au niveau des tissus cibles de l'insuline. Elle serait un mécanisme clef dans la pathogenèse du DT2. A ce titre, des approches pharmacologiques à visée anti-inflammatoires devraient progressivement trouver leur place dans la prévention et le traitement du DT2.

Notre étude portera sur l'enzyme Glycogène Synthase Kinase 3 Beta (GSK3 Beta), qui joue un rôle important dans les processus inflammatoires et notre objectif sera d'évaluer, *in vivo*, les effets anti-inflammatoires et pro régénératifs de l'inhibition de cette enzyme par des inhibiteurs spécifiques tels que le chlorure de Lithium (LiCl) et des oligonucléotides anti sens dirigés contre GSK3 Beta dans un modèle de diabète type 1 la souris NOD (Non Obese Diabetic) et un modèle de diabète de type 2 le rat GK.

Nous étudierons aussi, *in vivo*, les potentiels effets bénéfiques de cette inhibition de GSK3 Beta sur la survie d'îlots de Langerhans, humains ou de rongeurs, greffés en intramusculaire chez des animaux, rat Lewis et souris Nude, présentant un diabète.

Ce projet novateur devrait nous permettre de définir le rôle de GSK3 Beta dans l'inflammation insulaire et d'évaluer son potentiel, comme cible thérapeutique pour des approches pharmacologiques à visée anti-inflammatoire pour la prévention et/ou le traitement des diabètes.

Ce projet est prévu sur 5 années, durant lesquelles nous utiliserons :

- Pour l'étude *in vivo* sur les effets des inhibiteurs de GSK3 Beta 56 rats mâles GK (diabète de type 2), 56 rats mâles Wistar (non diabétiques), 240 souris NOD (diabète de type 1),
- Pour l'étude *in vivo* sur la survie de greffons d'îlots de Langerhans de rongeurs ou humains, 80 rats mâles Lewis receveurs de greffes d'îlots de rongeurs et 80 souris immunodéficiences Nude receveuses de greffes d'îlots humains.

Cette étude ne peut être envisagée qu'à partir de modèles animaux, seuls capables de nous permettre d'analyser, *in vivo*, l'évolution des phénomènes structurels et fonctionnels du pancréas endocrine sous l'effet de ces traitements par les inhibiteurs de GSK3 Beta.

Nous travaillerons sur le raffinement des procédures dans le respect de la règle des 3R. Nous veillerons à surveiller les points limites définis. Nous améliorerons aussi l'environnement d'hébergement par un enrichissement constitué de nid végétal. Pour les tests in vivo les animaux seront préalablement habitués à la contention.

A la fin de l'étude les animaux seront euthanasiés.

11194 Les maladies infectieuses sont fréquentes en élevage bovin, elles sont responsables de pertes économiques qui fragilisent les exploitations agricoles et impactent le bien-être des animaux. Le développement des connaissances sur l'immunologie des bovins est nécessaire pour améliorer les moyens d'intervention, notamment par la sélection d'animaux résistants aux maladies, permettant ainsi de réduire la fréquence et la sévérité des infections.

Le protocole expérimental consiste à étudier la réponse inflammatoire de la mamelle chez des vaches sélectionnées pour être plus résistantes ou plus sensibles aux mammites. Cet essai a pour objectif de mettre en évidence un lien entre la sensibilité des animaux aux mammites et une réponse inflammatoire de plus ou moins grande intensité. Ce protocole s'inscrit dans une démarche visant à mieux comprendre les mécanismes de l'inflammation et, à terme, d'améliorer la résistance aux mammites des vaches laitières.

L'essai concerne 80 vaches laitières de race Holstein, une moitié appartenant au lot « résistantes » et l'autre au lot « sensibles ». L'essai sera mené en fonction des dates de vêlage des animaux pour mesurer la réponse inflammatoire dans les deux mois après-vêlage.

L'inflammation sera induite par une infusion dans un des trayons des vaches d'un composé non infectieux mimant une infection bactérienne. L'infusion de l'agent inducteur d'inflammation se traduira par une inflammation modérée avec un pic 8h post-infusion et une résorption puis un retour à la situation d'origine dans les 4-5 jours suivant.

Une diminution de la production laitière est attendue dans les quelques jours suivant le déclenchement de la réponse inflammatoire avec un retour au niveau de production initial après cette période.

Le projet est conçu pour être en conformité avec les exigences 3R :

Remplacement : les informations collectées lors de ce protocole ne porteront pas sur des espèces modèles (souris) mais sur une espèce concernée par les mammites (vache). Par ailleurs, il n'existe pas de méthode alternative à cette approche du fait de la nécessité d'une évaluation globale de la réponse au niveau de l'animal.

Réduction : 2 groupes de 40 vaches sont nécessaires pour obtenir une puissance statistique permettant de comparer la réponse des animaux avec leur appartenance au lot résistant ou au lot sensible.

Raffinement : l'utilisation d'un composé non infectieux pour le déclenchement de l'inflammation réduit l'intensité de l'inflammation et permet de mimer les premières étapes d'une vraie infection. Les prises de sang réalisées ne nécessitent qu'une contention minimale, les animaux étant habitués à être pris au cornadis pour la distribution des aliments. La douleur causée par l'aiguille ne nécessite pas d'anesthésie.

11195 Les encéphalites chez l'homme présentent une incidence de 2 à 12 pour 100000 suivant l'âge des patients considérés et leur localisation géographique. Une fraction de ces encéphalites correspond à des cas de rage. Ils sont très souvent la conséquence d'une morsure de chien enragé et concernent principalement des enfants. L'OMS estime l'impact de la rage sur l'homme à au moins 50000 décès par an. Le laboratoire utilise des souris adultes ou âgées de 48 heures (génétiquement modifiées ou non selon les applications) pour l'isolement et le diagnostic des virus agents d'encéphalite et en particulier des lyssavirus (les agents responsables de la rage), pour des expériences concernant l'évaluation et la mise au point de nouvelles approches thérapeutique et vaccinale de la rage chez l'homme et enfin pour la compréhension des mécanismes liés à la

virulence et la pathogénie des lyssavirus en lien avec leur capacité à franchir la barrière d'espèce et à infecter l'homme.

Ces expérimentations suivent la règle des 3R :

Remplacement : ces expériences viennent compléter des expérimentations effectuées sur culture cellulaire et ne sont utilisées que lorsqu'elles représentent une étape incontournable pour l'avancement de la connaissance scientifique et non actuellement remplaçable par des tests *in vitro*.

Raffinement : Des mesures sont prises pour réduire la douleur, la souffrance (anesthésie, analgésie) et l'angoisse (plusieurs souris par cage, mise en place d'igloo et d'éléments d'enrichissement du milieu). Enfin, des points limites sont clairement définis et permettent d'éliminer toute souffrance inutile.

Réduction : l'analyse des résultats utilise des tests statistiques permettant de comparer dans les règles de l'art les données qualitatives ou quantitatives obtenues et limitant le nombre d'animaux au strict nécessaire. Environ 750 animaux seront utilisés selon trois procédures décrites ci-dessous.

Isolement, et diagnostic des virus responsables d'encéphalite et notamment des lyssavirus, agents de la rage chez l'homme.

L'isolement des virus fait de moins en moins appel à l'animal. Néanmoins il est parfois incontournable de procéder à l'utilisation de souris adultes ou mieux âgées de 48 heures lorsque des systèmes cellulaires alternatifs et susceptibles à l'infection n'existent pas ou seraient trop lourds à mettre en place dans un diagnostic de routine de laboratoire. La voie d'infection (injection par voie intramusculaire, par voie intracérébrale ou par voie intrapéritonéale) est choisie en fonction de la pertinence physiopathologique du modèle et des données existantes dans la littérature.

Tests d'efficacité vaccinale et d'activité antivirale

D'une façon générale, ces tests sont réalisés pour tester l'efficacité immunogène ou l'efficacité antivirale d'une préparation. Ils commencent soit par une phase d'immunisation avec la préparation (avec ou sans adjuvant) ou soit par l'injection du composé chimique qui comporte une ou plusieurs injections de la préparation par différentes voies. Le test d'efficacité réalisé *in vivo* (injection par voie intramusculaire ou par voie intracérébrale de l'agent infectieux contre lequel la préparation est supposée protéger) fait suite et complète les résultats obtenus *in vitro*.

Evaluation de la pathogénie d'agents infectieux responsables d'encéphalite et de lyssavirus en particulier.

Le contrôle de la rage dépend entre autres de la compréhension des mécanismes impliqués dans l'adaptation des lyssavirus à de nouvelles niches écologiques. Le laboratoire dispose d'un catalogue d'isolats présentant naturellement des mutations et du savoir-faire technique nécessaire à l'introduction de ces mutations dans d'autres isolats. L'expérimentation sur animaux permettra de relier la diversité génétique du virus avec les caractéristiques phénotypiques (pouvoir pathogène, diffusion dans l'organisme) de l'infection chez l'animal de laboratoire. La voie d'infection (injection par voie intramusculaire, intracérébrale ou intrapéritonéale) est choisie en fonction de la pertinence physiopathologique du modèle et des données existantes dans la littérature.

11196 La radiothérapie (RT) est un traitement locorégional des cancers, consistant à utiliser des rayonnements ionisants (dits aussi "rayons" ou "radiations") pour détruire les cellules cancéreuses. Actuellement, plus de 50% des patients atteints d'un cancer sont traités par radiothérapie à une étape de leur parcours de soin. Dans certains cas, la RT peut diminuer la croissance tumorale à distance de la zone irradiée (ex. métastases). En oncologie, ce phénomène est appelé « effet abscopal ». Les mécanismes régissant l'effet abscopal ne sont pas encore clairement établis, mais ils impliqueraient l'activation de la réponse immunitaire antitumorale, capable de détruire les cellules cancéreuses.

Les nanoparticules (NPs) d'oxyde d'Hafnium testées (diamètre compris entre 1 et 100 nm) sont inertes et conçues pour augmenter la dose de radiothérapie à l'intérieur de la tumeur, sans augmenter les dommages dans les tissus sains. Les propriétés physiques de ces nanoparticules leur permettent de générer de très importantes quantités d'électrons lors de leur exposition aux

radiations ionisantes, amplifiant ainsi la dose d'énergie létale déposée dans la tumeur. L'efficacité de la radiothérapie est donc démultipliée sans changer la dose de rayons-X.

Nous avons démontré dans de précédentes études que la combinaison « NPs+RT » permettait d'induire une réponse antitumorale plus efficace que la « RT » seule, ainsi que l'obtention d'un effet abscopal sur un modèle avec deux tumeurs sous-cutanées établies (tandis que la RT seule n'en est pas capable).

Afin d'évaluer l'impact du traitement NP+RT sur le processus métastatique, nous utiliserons dans cette nouvelle étude trois modèles de métastases expérimentales qui miment les processus biologiques intervenant dans l'apparition des métastases (dispersion des cellules par voie systémique, nidifications multiples dans un organe distant, développement de nodules métastatiques). Pour cela, des cellules cancéreuses seront injectées dans la circulation sanguine de souris immunocompétentes (déjà porteuses d'une tumeur sous-cutanée) afin de générer des métastases pulmonaires. La tumeur sous-cutanée sera ensuite traitée, ou non, par les NP, puis irradiée. Après quelques jours, les animaux seront euthanasiés et les métastases dénombrées.

Pour cette étude, nous utiliserons trois lignées cellulaires murines, par exemple B16F10 (mélanome) CT26 (cancer du colon) et 4T1 (Cancer mammaire), injectées chez les souris immunocompétentes C57Bl/6JRj ou BalB/C, seuls modèles capables de reproduire la complexité du développement tumoral et métastatique. Ces modèles de cancer chez les souris immunocompétentes ont été choisis en se basant sur la bibliographie existante et leur utilisation pour l'étude de traitements anti-cancéreux à travers toute la recherche en immuno-oncologie.

Les nombres de groupes testés et d'animaux utilisés par groupe pour chaque étude ont été limités au strict minimum, tout en garantissant la robustesse des études, soit un total de 723 animaux pour l'ensemble du projet. Toutes les procédures seront faites sous anesthésie locale (lidocaïne) ou générale (isoflurane). L'inconfort, la douleur ou l'angoisse des animaux potentiellement liés à la toxicité du composé (bien qu'aucune toxicité ne soit attendue) seront traités par des médicaments adaptés de type morphiniques.

11197 Les rythmes biologiques, qui oscillent avec une période proche de 24h (cycles circadiens), sont une caractéristique omniprésente de la physiologie des êtres vivants, facilitant l'entraînement au cycle de 24h généré par la rotation de la Terre. En l'absence de signaux de temps environnementaux (alternance lumière/obscurité), la plupart des organismes expriment par défaut une rythmicité endogène appelée période endogène, qui est proche de 24h. La synchronisation journalière de ce rythme endogène sur le cycle lumineux naturel serait ainsi peu coûteuse en énergie et permettrait un fonctionnement optimal de l'organisme. Dans ce contexte, la théorie de la résonance circadienne suggère une relation entre rythmes biologiques et longévité. Cette théorie propose que plus la période endogène d'un individu ou d'une espèce est proche de 24h, plus sa longévité est grande. Toutefois, cette hypothèse n'a jamais été testée expérimentalement chez un mammifère, et les mécanismes permettant d'expliquer pourquoi l'éloignement du cycle naturel de 24h affecte la longévité sont totalement inconnus. Nous émettons donc l'hypothèse que ce phénomène pourrait s'expliquer par la dépense métabolique que représente le recalage quotidien de la période endogène sur la photopériode naturelle : les animaux dotés d'une période endogène éloignée de 24h auraient à subir un recalage quotidien coûteux d'un point de vue métabolique, ce qui à la longue pourrait altérer leur survie et leur longévité.

L'objectif de ce projet est donc double : tester la théorie de la résonance circadienne chez un primate, et évaluer le coût métabolique du décalage par rapport au cycle lumineux naturel de 24h.

Le présent projet inclut deux études indépendantes utilisant les mêmes approches expérimentales.

1) « Résonance et longévité » Afin de tester la théorie de la résonance circadienne chez un primate nous allons sélectionner une cohorte d'animaux vieillissants. Cette cohorte d'animaux (au minimum une trentaine, âgés de plus de 6 ans) sera suivie pendant 3 ans. Chaque année leur période endogène sera mesurée (mise en condition de libre-cours ou free-run pendant 2 semaines pour voir s'exprimer la période endogène, procédures 1, 2, et 7) deux fois par an (une fois en fin d'hiver, une fois en début d'été deux mois plus tard) afin de tester l'effet de la saison sur la période endogène.

De nombreux paramètres métaboliques (métabolisme continu par calorimétrie, procédure 4), physiologiques (hormones de stress, procédure 5) et comportementaux (activité locomotrice spontanée, performances cognitives, procédures 1, 6 et 7) impliqués dans la survie et la longévité seront évalués.

2) « Résonance et métabolisme » Afin d'évaluer le coût métabolique du décalage par rapport au cycle lumineux naturel de 24h, nous avons choisi de tester l'influence d'un changement de régime photopériodique (modification de la durée totale du cycle jour/nuit, procédure 3) sur le métabolisme énergétique chez une seconde cohorte d'animaux. Ces animaux seront donc exposés artificiellement à des photopériodes éloignées de 24h (tout en permettant un entraînement circadien) pendant environ 4 semaines. Nous mesurerons alors les variations métaboliques, physiologiques et comportementales induites par ces changements de photopériodes (procédures 1,4, 6 et 7). Pour cette seconde partie, trente animaux adultes (âgés entre 3 et 4 ans) seront répartis dans des groupes contrôles et expérimentaux : cycle lumineux de 24 h (groupe contrôle, n=10) vs 22h (n=10) vs 26 h (n=10).

Dans les deux études, la mesure de la période endogène est réalisée en utilisant une méthode d'enregistrement télémétrique de l'activité locomotrice. Cette méthode consiste à placer, par chirurgie sous anesthésie, un implant sans fil de 2 g qui transmet en temps-réel la quantité d'activité locomotrice de chaque individu à un ordinateur. Ces données permettent de calculer la période endogène propre à chaque animal. Ces expériences ne peuvent être remplacées par des méthodes alternatives puisqu'elles nécessitent d'exposer l'animal au cycle naturel lumière/obscurité. Afin de répondre à l'exigence de réduction du nombre d'animaux, ces expériences seront réalisées sur un nombre maximal de 60 animaux, nombre suffisant pour démontrer l'existence d'un coût métabolique et cognitif à la resynchronisation de l'horloge biologique. Les effectifs, déterminés à partir d'un test de puissance, prennent en compte la variabilité interindividuelle attendue au sein des groupes expérimentaux pour les mesures de métabolisme et de cognition (voir description des procédures) et permettront de réaliser des tests statistiques avec assez de puissance (au minimum 85%).

Nous avons choisi de mener ces travaux chez un primate présentant des rythmes biologiques très marqués (significativement plus que nombreux rongeurs), une longévité importante qui permet un raccourcissement de la période à long-terme, et une période endogène avec une variabilité individuelle importante (comprise entre 22h et 24h).

11198 L'accumulation de graisses dans le foie appelées stéatoses hépatiques non alcooliques (NAFLD, non alcoholic fatty liver disease) sont les maladies du foie les plus fréquentes dans les pays industrialisés. Elles correspondent à un déséquilibre du métabolisme des glucides et des lipides. Bien que souvent asymptomatique, cette accumulation peut entraîner une réponse inflammatoire appelée stéatohépatite non alcoolique (NASH, non alcoholic steatohepatitis) qui favorise l'apparition de fibrose, de cirrhose, et du carcinome hépatocellulaire au stade ultime.

Les NAFLD sont très souvent associées au syndrome métabolique (obésité, diabète et hyperlipidémie). En effet, dans l'organisme, c'est le tissu adipeux qui est en charge du stockage des graisses afin d'éviter leur accumulation dans le foie et les autres organes où l'activité métabolique est importante. Cependant, la capacité de stockage de ce réservoir physiologique varie fortement suivant les individus et la prévalence varie avec l'origine ethnique des individus, ce qui suggère l'existence d'une prédisposition génétique.

À l'heure actuelle, la surveillance des patients ayant une stéatose ou une NASH n'est pas parfaitement codifiée et les traitements actuels ne sont pas très efficaces. La recherche sur la génétique de la NAFLD étudie les modifications dans la séquence nucléotidique des gènes qui pourraient être impliqués.

Dans le but de mettre en évidence des facteurs génétiques liés à la stéatose hépatique, une collection de polymorphismes (mutation génétique) couvrant le génome entier a été testée sur puces à ADN. Les résultats de cette étude démontrent une association très forte entre la quantité de graisses hépatiques et la présence de variants génétiques chez les patients étudiés.

Nos travaux au laboratoire, nécessitent le recours à de modèles animaux qui nous permettent d'étudier la maladie, et de découvrir les médicaments efficaces pour la combattre.

Le challenge consiste donc à placer l'animal dans toutes les conditions qui vont le prédisposer à développer la maladie avec les caractéristiques les plus similaires à celles qui sont observées chez l'Homme.

Un environnement de sédentarité associé à un apport calorique excessif et déséquilibré par voie alimentaire permet assez aisément de reproduire le syndrome métabolique (surpoids, diabète et dyslipidémie), chez un animal déjà prédisposé à le développer spontanément.

De plus, comme le stade ultime de la dégradation de la fonction hépatique qu'est l'hépatocarcinome, est difficile à atteindre expérimentalement, nous avons fait le choix d'employer une souche de souris qui présente en plus du syndrome métabolique une susceptibilité accrue à développer des tumeurs.

Nous aurons recours à une technologie de transfert de gènes faisant appel à des particules virales de type AAV (Adeno Associated Virus) pour exprimer le polymorphisme du gène qui a été identifié.

Ces virus génétiquement modifiés au laboratoire qui les commercialise servent de vecteur des séquences de gènes que nous voulons exprimer chez l'animal, ils ont une affinité préférentielle pour l'organe cible que nous voulons atteindre.

Ce projet a donc pour objectif dans une première phase de développer un modèle expérimental, de le valider c'est-à-dire s'assurer qu'il présente toutes les caractéristiques voulues pour finalement évaluer les propriétés des médicaments que nous développons.

La mise au point et l'utilisation de ce modèle hépato-spécifique seront réalisées au cours de la durée de 5 ans couverte par ce projet avec 906 souris.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal.

Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant. Le recours à des produits analgésiques de type morphiniques pourrait être envisagé pour gérer la douleur.

11199 Notre société est spécialisée dans le domaine de l'immunité innée et commercialise un grand nombre de réactifs de laboratoire relatifs à ce domaine d'application. Au sein du département R&D, nous souhaitons obtenir des anticorps monoclonaux de grandes affinités contre les différents récepteurs et adaptateurs de l'immunité innée. A ce jour, il y a très peu d'anticorps neutralisant de bonnes qualités disponibles dans le commerce dirigés contre les récepteurs de l'immunité innée. Nous commercialisons déjà quelques anticorps de ce type comme outils de recherche pour la communauté scientifique et souhaitons compléter nos gammes. Ces anticorps peuvent aussi être utilisés comme outils diagnostique et pourraient s'avérer avoir un intérêt thérapeutique après humanisation. Ce projet a donc pour but final d'obtenir des hybridomes produisant des anticorps monoclonaux sur différentes cibles de l'immunité via l'immunisation d'animaux contre ces cibles. Pour parvenir à cet objectif, nous avons développé des méthodes originales d'immunisation permettant d'obtenir des hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux de grandes affinités pour des cibles complexes comme des récepteurs membranaires par immunisation ADN et/ou protéique de souris et de rats. Ces méthodes raffinées d'immunisation, permettent de limiter fortement le nombre d'animaux nécessaire à immuniser par cible pour identifier des hybridomes sécrétant des anticorps de fortes affinités contre ces cibles. La production des anticorps est ensuite réalisée par culture *in vitro* des hybridomes, ce qui supprime l'utilisation d'animaux pour la production en elle-même des anticorps. La douleur, pouvant résulter de la mise en œuvre de certaines procédures opératoire (en particulier l'injection de l'ADN codant pour l'antigène d'intérêt), est prise en charge, dans nos protocoles, par la combinaison de l'anesthésie gazeuse (molécule

aux propriétés sédatives, narcotiques ; analgésiant ; myorelaxant) avec l'administration d'analgésiques en pré- et post-opératoire. D'autre part, afin de réduire tout stress ou détresse infligés aux animaux pendant l'expérimentation, nous mettons en œuvre des soins « per-opératoires » : vérification de la profondeur d'anesthésie (réflexe de retrait de la patte), surveillance de la fréquence respiratoire (couleur des muqueuses, pattes), utilisation de tapis chauffant durant toute l'anesthésie ; utilisation de gel oculaire protecteur durant l'anesthésie (ayant pour but de limiter le dessèchement oculaire afin de préserver l'intégrité de la cornée des animaux anesthésiés). L'ensemble de ces procédures sont des mesures de raffinement et contribuent au bien-être de l'animal tout le long de l'expérimentation ainsi qu'à améliorer la qualité des résultats (éviter des données incorrectes obtenues à partir d'animaux souffrants ou stressés).

L'ensemble de ce projet nécessitera 1 000 souris et 300 rats sur une période de 5 ans. Les procédures sont réalisées par du personnel qualifié et habilité dans le cadre de la réglementation en vigueur.

11200 Au sein de notre unité, nous travaillons principalement sur les maladies de la peau et plus particulièrement sur les cancers induits par les rayons ultraviolets de types B (UVB). Pour se faire, nous avons mis au point un protocole d'irradiation sur un modèle de souris permettant le développement et l'étude des tumeurs cutanées. Le processus de carcinogénèse engagé lors de ces irradiations se décompose en 3 étapes appelées l'initiation, la promotion et la progression tumorale.

Au cours de cette carcinogénèse, plusieurs voies métaboliques sont impliquées et notamment :

- Des dommages à l'ADN
- Des modifications du métabolisme énergétique mitochondrial
- Des changements au niveau du stress oxydatif

Chacune de ces voies fait intervenir des acteurs clefs, que l'on appelle des gènes et qui jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement de ces voies métaboliques.

Cependant, nous ne connaissons pas à l'heure actuelle le rôle précis et le degré d'implication de ces gènes dans l'initiation, la promotion et la progression des cancers cutanés UVB-induits.

Pour se faire, nous allons inactiver ces gènes chez un modèle de souris (via des outils génétiques ou des substances pharmacologiques), individuellement ou deux à deux, de manière à mieux comprendre comment ils fonctionnent et surtout comment ils interagissent entre eux.

Notre étude repose principalement sur l'irradiation de souris SKH-1 sauvages et/ou mutées (gènes inactivés) qui seront soumises ou non à un traitement pharmacologique afin d'étudier l'initiation, la promotion et la progression des tumeurs dans les cancers UVB-induits.

De plus, il a également été montré que ces 3 voies métaboliques étaient impliquées dans les processus de cicatrisation et de vieillissement cutané. Nous allons donc parallèlement étudier le rôle et les interactions qui existent entre ces gènes cibles dans ces 2 processus.

Ainsi pour la totalité du projet, nous prévoyons d'utiliser un total de 5625 souris échelonnées sur 5 ans en comptant n=15 souris par génotypes et par traitement testés.

Pour répondre à la règle des 3Rs :

- A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives suffisamment prédictives pour mimer les cancers cutanés semblables à ceux de l'homme. Les modèles cellulaires ou 3D actuels nous permettent seulement de travailler sur des dysfonctionnements isolés de la maladie et non sur la maladie dans son ensemble au sein d'un individu tout entier.
- Le nombre de souris nécessaire à la réalisation de ce projet a été scrupuleusement réduit au minimum en tenant compte de nos 10 ans d'expériences en matière de carcinogénèse UVB induite. En effet, les souris SKH-1 ne sont pas consanguines et par conséquent, nous avons toujours 2 ou 3 souris qui ne répondent pas aux irradiations ou peuvent avoir des réponses complètement atypiques par rapport au reste du groupe (croissance tumorale trop rapide ou trop lente), ce qui a été bien constaté au cours des 2 précédentes DAP obtenues. Pour ces raisons, nous démarrons l'étude avec n=15 souris par génotypes et par traitement testés de manière à avoir un maximum de

données en un minimum d'animaux utilisés (soit n=10 souris statistiquement exploitables à la fin de l'étude). Les animaux qui ne répondent pas favorablement seront néanmoins utilisés pour des prélèvements de peau et serviront de contrôle pour des analyses ultérieures.

- Des études pilotes ont été réalisées pour raffiner l'ensemble de nos procédures expérimentales sur les animaux de manière à réduire au minimum les temps d'exposition, les temps de contention et d'isolement afin de prévenir toute souffrance ou angoisse chez nos animaux.

De plus, une surveillance des animaux et une évaluation de leur bien-être sera réalisée quotidiennement par les intervenants et le personnels qualifiés de l'animalerie afin de s'assurer que tout au long du projet les animaux sont en bonne santé, sans comportement anormal ou signes de souffrance.

Si toutefois, une souris montre le moindre signe de souffrance ou d'inconfort, un antidouleur lui sera administré. Pour la réalisation de ce projet, nous avons également défini des points limites adaptés (cf. procédure) à chaque protocole et/ou situation nous permettant de prendre les décisions qui s'imposent face à la souffrance ou l'inconfort de nos animaux.

11201 La plupart des tissus de notre organisme se renouvellent tout au long de la vie. Ce mécanisme est lié à l'existence de cellules souches. Ce sont les « mères » de toutes les cellules car ce sont elles qui donnent naissance aux autres cellules de notre corps. A l'âge adulte, elles permettent à nos tissus de se renouveler et de se réparer lorsqu'ils sont endommagés. Différents groupes de chercheurs ont mis en évidence l'existence d'un nouveau type de cellules : les cellules souches cancéreuses. Il s'agit de rares cellules, présentes dans diverses tumeurs, qui pourraient être responsables de leur croissance, de leur propagation mais aussi de leur résistance aux traitements. Mieux connaître ces cellules pourrait expliquer pourquoi certains cancers récidivent mais pourrait aussi permettre d'améliorer le diagnostic et un meilleur ciblage des traitements. Les Cancers du Sein appelés Triple Négatif sont un sous-groupe de cancers agressifs et représentent 15% des tumeurs du sein. Ces tumeurs sont peu différenciées et pourraient être enrichies en cellules souches cancéreuses.

Notre équipe a montré dans les Cancers du Sein Triple Négatif, l'existence d'un niveau différent d'expression du récepteur à l'acide hyaluronique CD44. Ce récepteur, dont les fonctions principales sont associées à l'adhérence et la migration des cellules, a été montré comme pouvant participer à la tumorigenèse. La sous-population exprimant des niveaux élevés de CD44 membranaire représente en moyenne 5 à 10% des cellules tumorales et, après mise en culture en condition non adhérente de cette sous-population, ces cellules tumorales ont montré une capacité élevée à former des sphères suggérant un enrichissement en cellules souches cancéreuses. Pour prouver formellement que la fraction de cellules cancéreuses exprimant un niveau élevé de CD44 est effectivement enrichie en cellules souches nous devons montrer que ces cellules présentent, outre une capacité supérieure à former des sphères, une tumorigénicité chez l'animal significativement supérieure aux cellules n'exprimant pas ou peu le récepteur CD44. C'est l'objectif de ce projet. Nous allons injecter à des souris en sous-cutané des cellules humaines de cancers de sein triple négatif exprimant fortement ou faiblement CD44 et comparer leur capacité à former des tumeurs. Nous comparerons quatre lignées cellulaires.

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

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

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

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

Ce projet nécessite l'utilisation de 384 souris sur une durée de 2 ans et demi.

11202 L'insuffisance rénale chronique (IRC) se caractérise par de profondes altérations du métabolisme, dont des dyslipidémies (c'est-à-dire une élévation des lipides sanguins) et une insulino-résistance (c'est-à-dire un prédiabète). Des études réalisées dans notre laboratoire sur des modèles animaux d'IRC ont montré une dysfonction du tissu adipeux blanc associée à une perte de masse grasse et une redistribution de lipides dans le muscle et le foie suggérant un phénomène de lipotoxicité. Ce phénomène classiquement observé chez les animaux ou les patients obèses ou diabétiques de type 2 n'a pour l'heure jamais été observé dans l'insuffisance rénale et pourrait contribuer aux désordres métaboliques observés chez ces patients.

Ces travaux sont actuellement en cours de publication dans la revue « Néphrologie Dialysis Transplantation » (publication officielle de l'association européenne de néphrologie). Cette publication est en révision et pour qu'elle soit acceptée, il nous est demandé de réaliser une expérience complémentaire sur des animaux insuffisants rénaux nourris avec une diète obésogène afin d'induire une surcharge pondérale. Cette expérience complémentaire nous permettra d'évaluer la plasticité du tissu adipeux blanc chez l'insuffisant rénal (c'est-à-dire sa capacité à s'hypertrophier) et de vérifier si cela exacerbe le phénomène de redistribution des lipides déjà observé. A cette fin, l'insuffisance rénale sera induite chez la souris par une chirurgie de néphroréduction. Les souris seront alors nourries avec un régime alimentaire standard ou un régime obésogène (régime enrichi en graisses) et l'impact métabolique sera évalué. Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'insulino-résistance et du risque métabolique accru des patients IRC et ainsi d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques ciblant ces anomalies.

Le présent protocole expérimental implique l'utilisation de 40 souris de laboratoire (souche C57Bl6). L'insuffisance rénale chronique sera induite chez 20 souris et les 20 souris restantes serviront de contrôle. La moitié de chacun de ces groupes (soit un total de 20 souris) sera nourrie pendant 4 semaines avec le régime obésogène.

Conformité à la règle des 3 R : S'agissant d'une maladie systémique (syndrome urémique) et de l'induction d'une surcharge pondérale, toute expérimentation *in vitro* et/ou méthode substitutive est impossible et il nous est nécessaire de recourir à une expérimentation animale. Le nombre d'animaux nécessaire à cette étude (4 groupes de 10 souris) a toutefois été calculé au plus juste afin d'offrir la puissance statistique maximum. Le protocole chirurgical sera réalisé sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane offrant à la fois une bonne sécurité et un bon confort anesthésique. Un protocole d'analgésie (associant anesthésie locale per-opératoire et l'usage de dérivés morphiniques) permettra de prévenir et de contrôler les douleurs post-opératoires. Un enrichissement du milieu de vie à l'aide d'igloos en carton et de ouate de cellulose (permettant au souris de se fabriquer un nid) sera mis en œuvre pour l'hébergement des souris.

11203 La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie est caractérisée sur un plan clinique principalement par un ralentissement moteur et des tremblements. Au niveau cérébral, les symptômes ont été associés par une perte de neurones produisant la dopamine dans une région du cerveau. Cependant l'origine de cette maladie est encore mal connue. De nouvelles données suggèrent que l'accumulation anormale d'une protéine, dénommée l'alpha synucléine dans les neurones, serait une des causes de la mort des neurones dopaminergiques. Ce mécanisme, aujourd'hui mal compris, est considéré comme central dans la genèse et l'évolution de la maladie. Sa compréhension est donc essentielle dans le développement de nouveaux outils thérapeutiques.

Un modèle de maladie de Parkinson de surexpression d'alpha-synucléine dans le cerveau des rongeurs entraîne les symptômes typiques de la maladie de Parkinson et la perte des neurones

dopaminergiques. L'objectif de notre étude est d'utiliser ce modèle de maladie de Parkinson chez le rat et d'étudier l'effet neuroprotecteur d'une protéine humaine dans le cerveau des rats :

- sur les symptômes de la maladie de Parkinson.
- sur les neurones dopaminergiques.

Notre stratégie est dans un premier temps d'induire la maladie de parkinson en effectuant des injections intracérébrales d'un vecteur viral exprimant l'alpha synucléine dans le cerveau des rats et dans un deuxième temps de tester l'effet d'un traitement par l'administration intracérébrale d'une protéine humaine sur le développement de cette maladie. Afin d'observer l'effet de la protéine injectée sur la maladie de parkinson, le comportement moteur des animaux sera évalué. Les animaux seront euthanasiés 16 semaines après les chirurgies et des analyses histologiques seront faites afin de visualiser l'effet de la protéine administrée sur la perte des neurones dopaminergiques.

Dans le respect de la règle des 3 R :

L'analyse des effets pharmacologiques sur le comportement moteur nous contraint à utiliser des animaux. Le remplacement par des modèles *in vitro* actuels ne permettrait pas de répondre à notre question. Nous utiliserons 10 rats par condition expérimentale avec un total de 40 animaux. Ce nombre réduit reste suffisant pour obtenir une réponse statistique significative.

Pour le respect du R de raffiner, les souffrances liées aux chirurgies seront soulagées via les molécules les plus adéquates. Tout le long des expériences, plusieurs critères sont pris en compte pour suivre le niveau d'inconfort ou de souffrance des animaux et décider, le cas échéant, de procéder à l'arrêt de l'expérience si le point limite est atteint. Les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque étape. Pour leur bien-être, limiter leur stress et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, un réchauffement, une nourriture adaptée et des traitements vétérinaires si nécessaire.

11204 Afin de comprendre les mécanismes neurobiologiques impliqués dans la mémoire, la prise de décision ou l'addiction, il est nécessaire d'utiliser des modèles animaux pour pouvoir établir des liens de cause à effet entre la manipulation du fonctionnement cérébral et ses conséquences sur les comportements issus de ces fonctions cognitives. Ces études ne peuvent pas actuellement être remplacées par d'autres méthodes d'investigations.

Chez l'homme, la méthode la plus utilisée pour corréler une activité cérébrale à un comportement cognitif est l'IRM fonctionnelle. Chez l'animal, on utilisera des comportements moteurs pour mesurer l'expression d'un choix ou d'une mémoire. Ces comportements moteurs étant incompatibles avec l'IRM fonctionnelle, la possibilité de comparer les études conduites chez l'homme à celles conduites avec des modèles animaux est limitée. De plus, si la manipulation de l'activité cérébrale chez l'animal permet d'étudier des liens de causalité entre comportement et activité cérébrale au moyen de techniques électrophysiologiques, ces enregistrements se font dans des zones cérébrales choisies arbitrairement ce qui limite les analyses des réseaux impliquant plusieurs zones cérébrales.

La technique d'échographie par ultrasons ultra-rapides permet d'obtenir des paramètres semblables à ceux révélés par l'IRM fonctionnelle, comme des changements localisés de débit sanguin ou la cartographie du réseau vasculaire cérébral. Enfin, cette méthode permet d'effectuer des études et des analyses longitudinales sur les modèles animaux.

Nous souhaitons tester l'hypothèse selon laquelle cette technique pourrait réduire le nombre d'animaux nécessaire dans les analyses comportementales à venir, par un suivi longitudinal et le décours temporel des activations cérébrales. Cela permettra donc de raffiner les protocoles et de réduire les interventions sur l'animal (seule persistera une chirurgie d'implantation du support de la sonde à ultrasons). Enfin l'utilisation de cette technique pourra, à terme, remplacer les études

nécessitant l'euthanasie d'animaux dans le but de montrer, par histologie, les activations cérébrales nécessaires à l'expression d'un comportement. Pour atteindre ces buts, il est d'abord nécessaire de tester cet appareillage dans une utilisation associant l'expression d'activités cognitives et signaux générés par l'appareil. C'est le but de ce projet, prévu sur 6 mois, qui implique l'utilisation de 42 rats et 30 souris.

11205 Le sepsis (infection + réponse inflammatoire généralisée) représente un problème majeur de santé publique (une des premières causes de mortalité intra-hospitalière).

Malgré les nombreux essais cliniques visant à corriger les désordres inflammatoires, la mortalité est restée constante depuis 20 ans.

De façon plus préoccupante, du fait de son incidence en constante augmentation les projections américaines fixent un seuil à 1 million de cas annuels aux USA avant 2020.

Cette pathologie multifactorielle reste difficilement traitable. Sa modélisation, tant *in vitro* qu'*in vivo* représente encore un challenge que nous avons tenté de surmonter.

Le modèle de choc septique que nous avons standardisé est le modèle de Ligature Ponction Caecale (CLP) reconnu comme le plus proche de la clinique humaine et modulable en de nombreux aspects. Cette courte chirurgie est réalisée sous anesthésie générale, et, lors du réveil, les animaux sont observés deux fois par jour et reçoivent des antalgiques puissants.

Il est couramment utilisé afin d'induire un sepsis polymicrobien chez la souris et reproduire l'évolution de la réponse physiopathologique observée chez les patients.

Pour se rapprocher des conditions cliniques, les souris reçoivent une antibiothérapie pendant 2 jours après le début de la pathologie.

L'objectif est d'utiliser ce modèle pour mieux caractériser la physiopathologie du sepsis et la pathogénicité de souches bactériennes responsables d'infections nosocomiales afin d'envisager le test de différents traitements (immunomodulateurs, agents anti-infectieux ou facteurs de croissance).

Avec 40 animaux par essai (un groupe « contrôle » d'une dizaine de souris, 2 groupes CLP : « traitement » et « placebo » de 15 souris chacun) à raison d'un essai par mois, le nombre estimé de souris pour ces 5 années est de 2400 maximum. C'est le nombre maximum d'animaux qui sera utilisé pour ce programme. Il a été calculé au plus juste pour réduire autant que possible le nombre d'animaux utilisés et toutefois obtenir des résultats exploitables.

Il n'est pas actuellement possible de mimer les phénomènes physiologiques complexes qui sont à l'œuvre lors d'un choc septique chez l'Homme autrement qu'en utilisant un modèle *in vivo*. Nous avons choisi la souris parce que nous obtenons des résultats transposables à l'Homme du point de vue physiologique et immunologique. Pour étudier les phénomènes hémodynamiques, nous devrions utiliser d'autres modèles dans d'autres projets.

L'objectif de l'étude est également de réduire au maximum la mortalité des animaux au cours de l'étude en essayant d'améliorer la prise en charge post opératoire des animaux en particulier sur le plan nutritif. Ceci afin de nous permettre de limiter encore plus le nombre d'animaux utilisés en fin d'étude et d'améliorer les conditions de vie des animaux en post opératoire.

Une grille de scoring mise en place au laboratoire, un certain recul sur ce modèle et l'expérience des manipulateurs permettent une certaine anticipation et d'éviter toute souffrance inutile en prenant les mesures adéquates en fonction de l'évolution du tableau clinique. Lors des phases cliniques, un aliment enrichi et un gel hydrique sont mis à disposition des souris. Les groupes sociaux sont conservés tout au long des procédures et la température ambiante est maintenue élevée pour faciliter la thermorégulation des animaux en souffrance.

11206 La dépression est la pathologie mentale la plus fréquente dans nos sociétés contemporaines. La douleur chronique est un facteur déterminant dans l'apparition de cette pathologie avec une comorbidité douleur chronique/dépression qui atteint les 50%. Au laboratoire, nous avons mis en place et caractérisé, chez la souris, un modèle de douleur chronique qui s'accompagne d'un état

anxio-dépressif. Ce modèle de douleur neuropathique, appelé modelé du manchon ou "cuff" en anglais, est basé sur la pose d'un manchon de polyéthylène autour du nerf sciatique induisant le développement d'un état douloureux et anxio-dépressif 7 à 9 semaines plus tard. Des altérations affectant de nombreuses structures cérébrales ont déjà été impliquées dans la dépression ou dans la douleur, mais rares sont les études étudiant cette comorbidité.

Dans ce projet, nous proposons d'enregistrer, par électrophysiologie *in vivo*, chez la souris anesthésiée, l'activité électrique de deux structures cérébrales impliquées à la fois dans la douleur et la dépression. Ce sont d'une part, les neurones à la base du système de récompense du cerveau que sont les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA), et d'autre part, les neurones GABAergiques de la queue de l'aire tegmentale ventrale (tVTA). Ces derniers étant connus pour contrôler les premiers. Les enregistrements se feront à différents points temporels dans notre modèle. Cela permettra d'observer l'évolution de l'activité électrique de ces neurones pendant la mise en place de la douleur chronique, de la comorbidité douleur dépression puis quand seul le phénotype dépressif subsiste. À cela s'ajouteront des mesures de réponses à la morphine, un traitement classique de la douleur connue pour fortement moduler le système de récompense. Des tests comportementaux permettant l'évaluation (i) des propriétés récompensantes de la morphine (ii) des niveaux de douleur (iii) des niveaux d'anxiété et enfin (iv) des niveaux de dépression des animaux « cuff » au cours du temps seront réalisés. Cela nous permettra de valider nos résultats électrophysiologiques.

Le projet nécessitera au maximum 1198 animaux. Il sera conduit en respectant la règle des 3R. Les études comportementales et d'électrophysiologie *in vivo* nécessitent l'utilisation d'animaux et ne nous permet pas de remplacement. Notre expertise en électrophysiologie permet une évaluation au plus juste du nombre de neurones à enregistrer par groupe et par suite du nombre animaux nécessaire. Cela permet de réduire les effectifs des expériences au minimum. En ce concerne le raffinement, le bien-être animal sera amélioré grâce l'hébergement des animaux en groupe dans des cages enrichies. Les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie permettant de limiter ainsi la souffrance et le stress imposés aux animaux. Les animaux seront observés tous les jours afin de déceler tout signe d'inconfort ou de stress et des fiches d'évaluations individuelles nous permettront de suivre la bonne récupération des animaux après les chirurgies. Des points limites sont établis afin d'empêcher une souffrance non nécessaire aux animaux. Pour les études comportementales et électrophysiologiques, des tests statistiques non paramétriques seront utilisés (Wilcoxon, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis).

11207 Au cours des dernières décennies une hausse significative de pathologies de la reproduction masculine et féminine a été rapportée. L'origine commune semble être l'exposition à de nombreux polluants présents dans notre environnement.

La fonction de reproduction est une des premières fonctions à se mettre en place au cours du développement. Toute altération qualitative ou quantitative du développement de la lignée germinale risque d'avoir des répercussions qui ne se révéleront que très tardivement sur la fertilité de l'individu adulte. Parmi les polluants chimiques connus pour être responsables de telles altérations, le bisphénol A (BPA) est sans doute le plus médiatisé. En France, depuis le 1er janvier 2015, la mise sur le marché de tout conditionnement à usage alimentaire comportant du BPA est interdite. Il existe une vingtaine de bisphénols dont la moitié serait susceptible de substituer le BPA. Mais leur innocuité est toujours incertaine. Sur l'ensemble des bisphénols testés *in vitro* dans notre laboratoire, le bisphénol AF (BPAF) et l'éther de bisphénol A diglycidique (Bisphenol A DiGlycidyl ether - BADGE) apparaissent comme les plus délétères sur les cellules germinales murines. Toutefois, ce modèle ne nous a pas permis d'évaluer l'impact à long terme de ces bisphénols sur les capacités de reproduction de l'individu exposé *in utero*. En effet, la baisse du nombre de cellules germinales en fin de vie fœtale n'implique pas toujours des conséquences sur la fertilité de l'individu à l'âge adulte.

L'objectif principal de ce projet est d'évaluer l'impact d'une exposition fœtale à ces substituants potentiels du BPA, le BPAF et le BADGE, sur la survie et la différenciation des cellules germinales mâles et femelles.

Cette étude vise la caractérisation :

- 1- des effets d'une exposition fœtale aux substituts à court-moyen terme sur les cellules germinales mâles et femelles ;
- 2- des effets d'une exposition fœtale aux substituts à long terme sur les cellules germinales mâles et femelles, c'est-à-dire sur la capacité de reproduction ;
- 3- des mécanismes impliqués dans les effets des substituts.

Pour évaluer les effets à court-moyen terme des bisphénols sur les cellules germinales humaines, nous utiliserons un modèle de xénogreffe de gonades fœtales humaines mâles et femelles sur un rongeur. C'est le seul modèle expérimental autorisant le développement à moyen-terme de ces organes et la caractérisation des effets à court et moyen-termes des polluants sur les cellules germinales. Les gonades seront greffées chez des souris sous anesthésie gazeuse et les gonades fœtales humaines seront exposées au BADGE ou au BPAF pendant plusieurs semaines en administrant l'un ou l'autre des polluants dans l'eau de boisson des souris. A la fin de l'exposition et après euthanasie de l'animal, les gonades seront prélevées pour évaluer par analyses histologiques les altérations éventuelles d'une exposition aux bisphénols sur les cellules germinales fœtales humaines non différenciées. Différents paramètres seront évalués tels le nombre, la prolifération et l'apoptose des cellules germinales.

Ce modèle de xénogreffe ne permet pas d'évaluer les effets à long terme d'une exposition aux bisphénols sur la qualité et la fonction du gamète mature. Pour ces raisons, nous tirerons parti du modèle murin, sans xénogreffe, qui autorise cette approche « vie entière ». Nous exposerons des femelles gestantes au BADGE ou au BPAF en administrant le polluant dans l'eau de boisson pendant la seconde moitié de la gestation, période qui couvre des étapes critiques de différenciation germinale communes à l'espèce humaine, et évaluerons l'impact de cette exposition in utero sur la qualité gamétique et la fertilité à l'âge adulte. Outre les prélèvements des gonades et autres tissus nécessaires à cette étude, nous réaliserons des ponctions d'ovocytes ovulés chez la souris après hyperstimulation ovarienne par deux injections intrapéritonéales d'hormones gonadotropes. Le prélèvement des ovocytes sera réalisé après euthanasie de l'animal. La qualité des ovocytes récoltés sera alors évaluée par analyse du nombre de chromosomes. Ce modèle murin, nous permet ainsi d'évaluer les effets d'une exposition in utero sur la capacité de reproduction de l'individu exposé. Toutefois, pour établir un lien entre les altérations germinales observées dans la gonade fœtale humaine et les altérations de reproduction observées chez les souris exposées in utero nous devons vérifier les similitudes d'effets entre le modèle humain et le modèle murin en fin de vie fœtale. Pour ces raisons, nous caractériserons aussi les effets de l'exposition aux bisphénols sur les cellules germinales de souris en fin de vie fœtale.

Enfin, pour comprendre les mécanismes mis en jeu dans les effets des bisphénols sur la cellule germinale, nous utiliserons trois lignées de souris déficientes pour les récepteurs cibles des bisphénols. Le modèle d'exposition aux bisphénols sera similaire à celui cité précédemment. Après euthanasie de la femelle gestante exposée, les fœtus seront prélevés et les gonades seront analysées par histologie pour quantifier le nombre de cellules germinales et caractériser l'impact de cette exposition sur leur différenciation.

Pour ce projet de 5 ans, 1785 animaux ont été prévu, soit 360 animaux par an. Les animaux étudiés sont nés et ont été élevés dans des élevages établissements agréées. Le nombre d'animaux prévu pour ce projet a été réduit au maximum tout en conservant un effectif suffisant pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux, dont l'état de santé sera surveillé quotidiennement tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de stress ou de souffrance. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Les expériences seront menées progressivement et tout protocole induisant un stress ou une souffrance inattendue lors des premières expérimentations sera évidemment arrêté.

11208 La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie est caractérisée sur un plan clinique principalement par un ralentissement moteur et des tremblements. Les symptômes ont été associés à une perte de neurones produisant la dopamine au niveau cérébral. Les traitements actuels visant à soulager ces symptômes ne sont pas optimaux. Le développement de nouveaux outils thérapeutiques est donc essentiel.

Notre étude est basée sur l'utilisation d'un modèle animal (rat) de la maladie de Parkinson permettant de reproduire les symptômes typiques de la maladie de Parkinson ainsi que la perte de neurones dopaminergiques. Le principe repose sur l'injection intracérébrale d'une neurotoxine qui cible et lèse spécifiquement les neurones dopaminergiques. Ce modèle ainsi généré permet donc d'étudier la perte de motricité due au manque de dopamine dans le cerveau.

Dans cette étude, nous allons évaluer l'efficacité d'un nouveau traitement pharmacologique administré de manière chronique durant 15 jours sur le comportement moteur chez ces animaux « rendus parkinsonien ».

Dans le respect de la règle des 3 R :

L'analyse des effets pharmacologiques sur le comportement moteur nous contraint à utiliser des animaux. Le remplacement par des modèles *in vitro* actuels ne permettrait pas de répondre à notre question. Afin de réduire le nombre d'animaux, tout en ayant assez de données pour établir des statistiques solides, 30 rats seront sélectionnés sur 35 au total en fonction de leur score comportemental et seront testés à 2 doses différentes ou le contrôle. Pour le respect du R de raffiner, les souffrances liées aux chirurgies seront soulagées via les molécules les plus adéquates. Tout le long des expériences, plusieurs critères sont pris en compte pour suivre le niveau d'inconfort ou de souffrance des animaux et décider, le cas échéant, de procéder à l'arrêt de l'expérience si le point limite est atteint. Les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque étape. Pour leur bien-être, limiter leur stress et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, un réchauffement, une nourriture adaptée et des traitements vétérinaires si nécessaire.

11209 L'obésité est un problème socio-économique majeur de notre société avec près de la moitié de la population française en surpoids ou obèse. Cette pathologie est causée par un déséquilibre de la balance énergétique correspondant à des apports alimentaires excessifs associés à une faible dépense énergétique engendrant ainsi une prise de masse grasse importante et un état inflammatoire chronique. L'obésité peut engendrer des complications physiopathologiques tel que le diabète de type 2 (TD2), mais aussi des conséquences cardiovasculaires et respiratoires. Les causes de l'obésité sont diverses. De nombreux facteurs y contribuent comme la prédisposition génétique, l'environnement, le statut hormonal de l'individu, le manque d'activité physique, la sédentarité, l'alimentation mais aussi, directement ou indirectement, le microbiote. Outre la prise en charge chirurgicale et médicamenteuse qui correspondent à des mesures dites « ultimes », la mise en place de conseils et mesures hygiéno-diététiques (incluant des régimes hypo-énergétiques et/ou une augmentation du niveau d'activité physique) reste à privilégier.

Le microbiote constitue un écosystème complexe qui est aujourd'hui reconnu comme étant impliqué dans la santé de l'homme. Le déséquilibre ainsi que la diminution de la richesse et de la diversité microbienne intestinale, peuvent favoriser l'apparition ou le maintien d'une obésité. De ce fait, cela devient une cible thérapeutique intéressante dans la lutte contre le surpoids. L'activité physique et une alimentation riche en acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) acide alpha-linolénique (ALA) sont également des pistes pour tenter de restaurer un équilibre de la composition microbienne intestinale. La mise en place d'une activité physique régulière ou d'une complémentation nutritionnelle spécifique pourrait ainsi être envisagée dans un contexte d'obésité. Outre son effet

sur la composition corporelle et sur l'inflammation et le métabolisme, l'activité physique a potentiellement un impact sur la balance microbienne en faveur d'un meilleur équilibre de la balance bactéries bénéfiques et bactéries pathogènes. D'autres études ont montré des effets positifs d'un entraînement intermittent de haute intensité (HIIT) sur la composition corporelle et le microbiote intestinal. Sur un plan nutritionnel, les AGPI n-3, synthétisés par les végétaux terrestres ou marins, peuvent se retrouver dans des huiles végétales ou dans les tissus des animaux qui les auront consommés (Huile et Graine de lin, huile de noix et de colza, poissons gras, algues, herbe ...) et agir sur le microbiote. L'huile de lin est riche en acide alpha-linolénique (ALA), précurseur des AGPI n-3, avec un ratio AGPI n-6/AGPI n-3 faible. Une supplémentation en huile de lin riche en AGPI n-3 pourrait prévenir le déséquilibre du microbiote provoqué par l'obésité et l'inflammation intestinale. Ainsi, si indépendamment, l'activité physique (dont l'HIIT) et les AGPI n-3 ont déjà démontré des effets bénéfiques sur la santé dans un contexte d'obésité, la question se pose de savoir si un apport en AGPI n-3 associé à un programme d'HIIT pourrait, par interaction, augmenter les effets bénéfiques sur l'inflammation ainsi que sur la composition corporelle en tentant de rééquilibrer le microbiote.

Pour cette étude, 60 rats Wistar âgés de 8 semaines suivront un régime riche en lipides pendant 16 semaines dans des cages individuelles, puis seront répartis en différents groupes et certains suivront, pendant 12 semaines, un programme d'activité physique (HIIT) et/ou un régime supplémenté en huile de lin riche en ALA intégré directement dans leur alimentation. Nous attendons de cette étude une meilleure compréhension des processus menant à une diminution de l'inflammation chronique suite à un programme d'activité physique associé à une alimentation supplémentée en ALA.

Dans sa globalité, le projet de recherche proposé permettra d'identifier les moyens de faire évoluer les comportements vers des pratiques saines et durables et mettra à disposition des éléments pour orienter les politiques publiques et privées dans le but d'améliorer à la fois la santé et le bien-être des populations. Il permettra également d'apporter de nouveaux éléments visant à terme à déterminer l'impact de l'environnement et des pratiques sociétales sur le microbiote intestinal et sur la santé humaine et à proposer des alternatives inédites aux traitements biologiques.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) pour l'expérimentation animale. Afin de comprendre les mécanismes adaptatifs au complément et/ou l'entraînement, nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation *in vitro*, *ex vivo* ou *in-silico*. Le nombre d'animaux par lot est toutefois limité au maximum (à partir d'un test de puissance en lien avec la littérature. Les rats (n=60) seront mis en cage individuelle dans un environnement enrichi avec une balle en inox dès leur arrivée. Bien que l'isolement induise un stress sur l'animal, il est nécessaire pour cette étude pour le suivi hebdomadaire de la prise alimentaire. Toutefois, les cages seront transparentes et collées les unes aux autres ainsi elles permettront aux animaux de se voir et se sentir.

Aucune procédure très douloureuse n'est prévue. Toutefois, si besoin, nous mettrons en œuvre des méthodes permettant de limiter au maximum toute éventuelle souffrance de nos animaux (mise en place de points limites, utilisation de cages adaptées et surveillance quotidienne des animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins ou d'exclusion d'animaux en souffrance).

11210 L'épilepsie qui affecte environ 1% de la population est une atteinte neurologique associée à des désordres neurologiques dont l'origine est mal connue. Elle peut se traduire par des convulsions spectaculaires. Parmi les patients atteints, environ 30% répondent mal aux traitements pharmacologiques et la chirurgie est alors employée pour éliminer le foyer épileptique. Cette réponse médicale est très lourde, et l'utilisation de nouveaux traitements a toujours été recherchée, en vue de son remplacement. De nombreuses études sur l'épilepsie sont réalisées dans le monde. Il en émerge, qu'en dehors des désordres de nature génétique, un défaut dans l'organisation des neurones et des cellules gliales produit des synapses défectueuses dont l'activité serait à l'origine des crises observées. Cette organisation en réseau des cellules nerveuses ne peut malheureusement pas être reproduite en culture. De façon intéressante, le traitement des patients par chirurgie permet d'obtenir, avec le consentement requis pour chaque patient, du matériel

humain pour la recherche, mais dont la durée de vie au laboratoire est courte. Notre projet va justement nous permettre d'utiliser ce matériel à plus long terme, et d'approcher la compréhension des mécanismes conduisant à l'épilepsie tout en ouvrant la perspective de tester de nouveaux agents pharmacologiques antiépileptiques. Ainsi, notre objectif est d'obtenir en culture des progéniteurs à partir des spécimens humains puis de les greffer dans le cerveau de souris nouveaux nés (xénogreffe) pour leur permettre de s'y développer soit en neurones, soit en cellules gliales. Dans cet environnement murin *in vivo*, s'établiront ainsi des réseaux synaptiques fonctionnels qui intègrent des cellules humaines de patients épileptiques. Pour mesurer l'impact des cellules humaines sur ces réseaux, des mesures d'électroencéphalographie (EEG) seront réalisées. Dans ce projet, nous envisageons 2 greffes par mois sur un lot maximum de 6 souris par patient (ce nombre est évidemment dépendant de la disponibilité des tissus humains et du nombre de souris par portée) soit environ 120 souris par an et donc, sur 5 ans, 600 animaux pour la greffe. Il faut y ajouter environ 150 animaux qui constitueraient les accouplements durant cette période. Bien que des greffes de cellules humaines aient déjà été réalisées chez la souris dans d'autres laboratoires internationaux, nous ne pouvons présager de la survie et/ou du bon développement des greffes que nous nous proposons de mettre en œuvre. Dès les premiers résultats, nous essaierons de réévaluer à la baisse le nombre de souris proposé pour le réduire au strict minimum. Pour réaliser la greffe en limitant la douleur et en diminuant la contrainte imposée aux animaux, les procédures d'anesthésie et d'analgésie seront respectées rigoureusement au cours de l'expérimentation. Après la greffe, les souriceaux greffés seront surveillés quotidiennement jusqu'à l'âge adulte. Tout animal montrant un problème de confort suite à la greffe sera mis sous surveillance accrue. Une attention particulière sera donnée si l'animal se gratte, présente une plaie, ou montre des signes de douleurs auquel cas il sera euthanasié. De par l'incidence de l'épilepsie chez l'homme, notre projet présente donc un intérêt scientifique et sociétal évident. Bien que de nombreuses équipes de recherche travaillent sur cette maladie à travers le monde, nous proposons une approche nouvelle qui pourra être mise en œuvre grâce aux compétences et savoir-faire de notre laboratoire.

11211 Ce projet a pour objectifs d'évaluer la qualité de nouveaux vaccins ou de vaccins existants grâce à l'imagerie par fluorescence et/ou par bioluminescence.

Les critères d'évaluation sont :

- la protection des vaccins développés en traitements préventifs et/ou thérapeutiques de maladies infectieuses grâce : Au suivi des pathogènes (bactéries/virus génétiquement modifiées) ou marqués par des molécules fluorescentes

Au suivi des cellules immunitaires impliquées dans la protection

- la biodistribution et le mécanisme d'action des différentes molécules (ex : antigènes, adjuvants, anticorps, nanoparticules).

L'évaluation de la protection des vaccins sur animaux et leur biodistribution *in vivo* est l'une des méthodes utilisée pour démontrer leur efficacité préclinique. Elle permet de documenter les dossiers réglementaires avant d'envisager des études cliniques chez l'homme.

Le suivi de certaines molécules d'intérêt par fluorescence est possible grâce à un fluorochrome (molécules assez petite) pouvant se greffer sur des molécules biologiques avec une perturbation nulle ou minimale de leurs propriétés physico-chimiques. Ainsi, la fluorescence peut par exemple être utilisée pour un suivi de biodistribution effectué sur des anticorps, des peptides, ou bien des acides nucléiques.

L'imagerie par bioluminescence est une modalité faisant appel au génie génétique. Son principe repose sur l'intégration du gène codant pour la luciférase qui est une enzyme présente, à l'état naturel, dans des organismes tels que la luciole ou l'anémone de mer. Si ce gène est correctement intégré, les cellules vivantes exprimeront la luciférase qui, au contact de son substrat, la luciférine, donnera lieu à une réaction enzymatique émettrice de photons. Ces photons seront détectés par la caméra à haute sensibilité. Il sera alors possible de localiser et de quantifier *in vivo* les cellules ayant intégrées la construction luciférase.

Le nombre maximum d'animaux qui seront utilisés dans ce projet d'une durée de 5 ans est de 5000 souris, 500 hamsters, 300 rats, 300 rats hispidés, 200 lapins, 100 miniporcs, 100 macaques cynomolgus.

Mise en œuvre des 3R

Remplacement :

Des essais *in vitro* sont également utilisés pour déterminer les seuils de détection *in vitro* et *ex vivo* des appareils d'imagerie, ils apportent des données complémentaires mais, à ce jour, ne peuvent se substituer aux essais *in vivo* sur des organismes entiers.

Réduction :

Les schémas expérimentaux de ce projet feront l'objet d'une revue par des biostatisticiens, afin de calculer au plus juste le nombre d'animaux nécessaire. Il est à noter que l'imagerie *in vivo* permet un suivi longitudinal sur une durée définie de chaque animal qui est par conséquent son propre témoin, ce qui permet de réduire considérablement le nombre d'animaux par étude.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des dispositifs d'enrichissement. Les locaux utilisés sont conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé. De plus, le raffinement réside dans deux caractéristiques principales. Tout d'abord, cette technique est non invasive puisque les souris sont simplement anesthésiées pendant une courte durée lors des acquisitions d'images et réchauffées grâce à un plateau chauffant afin d'éviter les risques d'hypothermie. D'autre part, la sensibilité des appareils d'imagerie *in vivo* permet de diminuer les doses de pathogènes administrées aux animaux par rapport aux modèles classiques.

11212 Les affections ostéoarticulaires chroniques ou rhumatismales sont la première cause de morbidité au monde en touchant environ 20% de la population et tout particulièrement les adultes de plus de 50 ans. Ces pathologies fortement invalidantes se manifestent de façon aiguë et chronique par de l'inflammation entraînant des douleurs intenses et des pertes de fonctionnalité. L'arthrose est causée par la dégénération des articulations due à une usure progressive du cartilage. En plus de cette usure, l'arthrose est associée à un remodelage des os sous cartilagineux, la formation d'excroissances osseuses (les ostéophytes), un affaiblissement des ligaments et des muscles et dans les cas les plus sévères, une inflammation articulaire. Les traitements de l'arthrose sont basés principalement sur le soulagement de la douleur et de l'inflammation mais il n'existe malheureusement à ce jour aucun traitement permettant de guérir la douleur chronique ou la dégradation du cartilage. Les traitements principalement utilisés à ce jour sont le paracétamol, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les infiltrations de corticoïde, la chondroïtine sulfate et la glucosamine. La mise au point de nouveaux traitements de l'arthrose est donc nécessaire.

Dans le cadre de ce projet, notre société développe des molécules bifonctionnelles associant chimiquement une partie HBP (hydroxybisphosphonate) à des molécules chimiques possédant des activités analgésiques/anesthésiques. De par sa forte affinité pour le tissu osseux articulaire, l'HBP permet d'y vectoriser différents types de molécules chimiques en augmentant leur concentration locale tout en diminuant leur concentration circulante (souvent responsable d'effets secondaires). L'objectif de ce projet est ainsi de développer de nouveaux traitements antalgiques spécifiques des douleurs arthrosiques.

Les études précliniques permettront de sélectionner 3 futurs candidats thérapeutiques.

Ce projet est divisé en 3 étapes :

- Procédure expérimentale n°1 : Administration des molécules à des rats sains à différentes concentrations dans le but de déterminer la dose maximale tolérable et de choisir la dose qui sera ensuite utilisée lors des tests d'efficacité. Le traitement sera administré 1 à 2 fois par jour de J1 à J5. La procédure 1 comptera au maximum 132 rats (10 molécules x 4 doses x 3 rats + 3x4 contrôles).

- Procédure expérimentale n°2 : Optimisation du monitoring de la douleur dans le modèle MIA (monosodium-iodoacétate) rat (modèle d'arthrose induite par injection intra-articulaire de iodoacétate au niveau du genou). Le modèle sera induit à J1 et les rats seront euthanasiés à J5. La procédure 2 comptera au maximum 54 rats (3 études x 3 groupes (Contrôle (CT), MIA, MIA+traitement référence) x 6 rats)

- Procédure expérimentale n°3 : Evaluation de l'efficacité des molécules vectorisées dans le modèle de douleur MIA rat. Le modèle sera induit à J1, le traitement sera administré 1 à 2 fois par jour de J1 à J5, puis les rats seront euthanasiés à J5. La procédure 3 comptera au maximum 132 rats [(4 groupes contrôles (CT, MIA, MIA+traitement référence, MIA + molécule non vectorisée) x 6 rats X 3 protocoles = 72 rats) + (10 molécules test (MIA + molécule vectorisée) x 6 rats = 60 rats).

Au total, sur 5 ans, nous utiliserons un maximum de 318 rats (132 +54 +132).

Nos études seront planifiées pour respecter au mieux la règle des 3R pour : Remplacer, réduire, raffiner.

Ainsi pour améliorer la possibilité de remplacer, les molécules synthétisées seront dans un premier temps testées *in vitro* afin de comparer leur cytotoxicité par rapport aux molécules natives et d'évaluer leur efficacité sur un modèle cellulaire (neurones nocicepteurs) ce qui permettra de réduire le nombre de candidats à tester *in vivo*.

Pour améliorer la possibilité de réduire, les tests de dose puis d'efficacité des molécules seront regroupés afin de limiter le nombre d'animaux, en utilisant un même groupe contrôle pour comparer plusieurs molécules bifonctionnelles. De plus, le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessité la réalisation d'une deuxième étude.

Pour améliorer la possibilité de raffiner, nous mettrons en place de mesures spécifiques et adaptées aux douleurs occasionnées pour éviter toute souffrance inutile et prolongée : les conditions d'hébergement seront optimisées (litière spécifique, augmentation de l'enrichissement, facilité d'accès à l'alimentation), nous utiliserons un anesthésique lors de l'induction de la pathologie. Un suivi quotidien des animaux sur des caractéristiques spécifiques (locomotion, sensibilité mécanique et thermique) sera effectué. Tout animal ayant atteint les points limites (repéré le plus précocement possible grâce à un suivi quotidien) sera euthanasié. Nous maintiendrons les animaux le minimum de temps nécessaire dans une situation de douleur : la phase de douleur sera limitée à 5 jours.

A terme, les meilleurs candidats devront ensuite faire l'objet d'études précliniques complémentaires réglementaires répondant aux guidelines ICH (International Council for Harmonisation), afin de retenir une molécule qui pourra alors être administrée chez le patient dans le cadre d'essais cliniques. L'objectif final étant de proposer de nouvelles solutions antalgiques aux patients atteints d'arthrose ou autres douleurs d'origine osseuse.

11213 Ce projet s'inscrit dans le cadre du développement de vaccins thérapeutiques anti-cytokine, et ciblant la cytokine interféron-alpha. Le candidat vaccin, appelé kinoïde, qui cible l'interféron-alpha est ainsi noté IFN-kinoïde (ou IFN-K). Ce kinoïde IFN-K est actuellement évalué en phase clinique internationale de stade IIb chez des patients souffrant de lupus.

Certaines pathologies autoimmunes se déclenchent ou se développent à cause de la surexpression de cytokines. Suite à l'administration du kinoïde, celui-ci agit en induisant une production par le système immunitaire du patient d'anticorps capables de neutraliser l'activité biologique de la cytokine ciblée. Des travaux scientifiques relatent la surexpression de la cytokine interféron-alpha dans le diabète de type I. Cela nous conduit à tester l'approche IFN-kinoïde dans cette pathologie.

De nombreuses études ont modélisé l'induction du diabète de type I chez la souris C57BL/6 mâle, à la suite de multiples injections à faible dose de streptozotocine, un analogue chimique du glucose couplé à une toxine. Notre projet consiste donc à induire le diabète de type I par des injections de streptozotocine (une injection à 40 mg/kg par jour pendant 5 jours consécutifs), chez des souris préalablement immunisées avec le kinoïde IFN-K. Le projet consistant à immuniser des souris avec

le kinoïde IFN-K et de suivre la réponse immune suite à ces immunisations a déjà été approuvé du point de vue éthique.

Pour répondre à notre problématique, certains groupes seront traités avec le kinoïde IFN-K puis recevront 5 injections de streptozotocine. Ils seront comparés avec des groupes contrôles (recevant le même kinoïde IFN-K puis le tampon de dilution de la streptozotocine, ou du PBS au cours des immunisations, puis la streptozotocine, ou encore ne recevant que les injections de streptozotocine pour induire le diabète). Des variations pourront porter sur le choix de l'adjuvant utilisé lors des immunisations avec l'IFN-K.

Nous étudierons dans ces différents groupes l'immunogénicité du candidat vaccin IFN-K, ainsi que la survenue du diabète par des mesures régulières de glycémie. Ce projet permettra également d'étudier les variations éventuelles d'immunogénicité ou de survenue du diabète dues à un changement d'adjuvant.

L'étude d'une réponse humorale nécessite d'utiliser des animaux vivants, qui ne peuvent être remplacés par des modèles cellulaires par exemple. De plus, en accord avec les exigences de réduction et de raffinement, le nombre d'animaux par groupe sera limité, afin de conférer une puissance statistique suffisante pour ce protocole expérimental. Nous utiliserons 10 souris par groupe, donc 70 souris mâles dans ce projet, par an. D'autres études incluses dans ce projet, et réalisées dans les années futures, pourront présenter des variations par exemple sur le calendrier d'immunisation, ou la dose de streptozotocine utilisée pour induire le diabète. Nous nous référons également à des données publiées dans la littérature pour ne pas inclure certains groupes contrôles, en accord avec la règle de réduction.

Dans ce protocole au cours duquel le diabète de type I va survenir suite aux injections de streptozotocine, une attention et un suivi particulier seront portés aux animaux, de façon quotidienne afin de s'assurer de leur bien-être. Un apport toujours suffisant en eau et alimentation sera réalisé pour les animaux, par rapport à leur consommation accrue associée au développement du diabète. Les points limites seront évalués de manière à éviter toute détresse ou souffrance des animaux inclus dans le protocole. En particulier, le poids des animaux sera régulièrement suivi (à l'arrivée des animaux, une fois par semaine à partir de la 10^e semaine d'âge, puis 3 fois par semaine à partir de la semaine suivant les injections de streptozotocine), de façon à détecter une perte de poids associée à la pathologie. Les animaux détectés en souffrance seront euthanasiés.

11214 Les fonctions du colon sont principalement l'absorption de l'eau, des sels minéraux et vitamines et la formation de fèces pour leur élimination. Le cancer colorectal se forme dans le colon. Il est une des plus grandes causes de mortalité par cancer en Europe. Notre projet porte sur l'étude du rôle des fibroblastes, cellules qui composent le stroma ou appelé également le tissu conjonctif, dans le colon. Deux axes de recherche seront développés :

- Comprendre le rôle des fibroblastes dans le maintien de l'architecture tissulaire dans un colon sain.

- Etudier le rôle des fibroblastes dans la formation et la progression des tumeurs colorectales

Pour répondre à cette problématique, nous utiliserons des modèles de souris transgéniques exprimant des protéines fluorescentes dans une catégorie de fibroblastes. Pour l'étude des tumeurs colorectales, nous prévoyons d'induire ces souris par un carcinogène. Ainsi les fibroblastes étant marqués par une fluorescence, nous pourrons les suivre et comprendre leur rôle dans la formation et dans la progression tumorale. Cette étude permettra de comprendre le rôle peu connu du microenvironnement stromal dans les processus physiologiques et pathologiques coliques.

Le nombre de souris est estimé à 59 souris pour l'ensemble du projet.

L'organisation générale, le développement et le fonctionnement du colon que nous étudions sont très similaires chez la souris et chez l'homme. Le modèle souris est donc très utilisé dans la communauté scientifique afin d'étudier les mécanismes de la tumorigenèse intestinale.

Ce projet est en accord avec la règle des 3Rs :

- Remplacer : Pour comprendre le rôle des fibroblastes dans des processus physiologiques et tumoraux *in vitro*, nous avons développé des cultures organotypiques à partir d'un épithélium colique sain (organoïdes sains) et de tumeurs colorectales (tumoroïdes). Nous étudions les interactions entre ces organoïdes/tumoroïdes et des lignées de cellules fibroblastiques en 2D et 3D. Cependant, ces études restent imparfaites car elles ne récapitulent ni la richesse des fibroblastes présents dans le stroma ni la complexité d'un organisme.

- Réduire : Le nombre d'animaux utilisés est ajusté au plus bas mais compatible avec l'obtention de résultats fiables.

- Raffiner : Les souris transgéniques utilisées ne présentent pas de phénotypes qui induisent de la souffrance. Le traitement par le carcinogène induit la formation de tumeurs qui sont spécifiques au colon. Nous resterons vigilants quant à la souffrance des animaux grâce à une surveillance quotidienne et une grille de score permettra d'arrêter l'expérience selon des critères objectifs d'apparition de symptômes.

11215 Le cerveau est constitué de neurones ainsi que d'un autre type cellulaire au moins aussi abondant appelé astrocytes.

Alors que le rôle des neurones dans le fonctionnement cérébral est largement reconnu et étudié, l'implication des astrocytes et de leurs interactions avec les neurones dans le contrôle des fonctions cérébrales dans un contexte normal ou pathologique reste très peu connu. Tel est précisément le but de ce projet. Pour accéder à l'activité des astrocytes et des neurones, nous travaillerons chez la souris. Ce projet vise à étudier le rôle d'une protéine astrocytaire dans l'addiction. En effet, les astrocytes ayant un rôle prépondérant dans la régulation des niveaux de neurotransmetteurs dans l'espace de communication entre deux neurones (synapse), nous nous proposons d'étudier le rôle de cette protéine astrocytaire en réponse à un traitement chronique aux psychostimulants de type cocaïne dont la consommation a quasiment triplé au cours de ces 15 dernières années (cocaïne, MDMA/ecstasy et amphétamines : évolution de 3,8% depuis 2000). Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées, déficientes pour cette protéine. Elles ne présentent pas de déficit développementaux, locomoteurs ou comportementaux. Le seul déficit connu chez ce modèle murin est l'absence d'apprentissage de la peur, qui n'entre pas en compte dans l'étude proposée ici. Nous comparerons leur comportement locomoteur après une prise de cocaïne (par injection intrapéritonéale) à celui de souris non génétiquement modifiées. Le test de sensibilisation locomotrice est le plus appropriée pour étudier les effets directs de la cocaïne sur l'animal car la cocaïne est une drogue connue pour ses effets locomoteurs. C'est d'ailleurs le test le plus utilisée en littérature pour étudier les effets de la cocaïne sur un modèle animal.

De plus, nous déterminerons la spécificité régionale de l'implication de la connexine 30 dans le circuit de l'addiction à la cocaïne et ses effets locomoteurs en rétablissant l'expression de cette protéine dans une région spécifique du cerveau, le noyau accumbens. Pour cela, nous utiliserons des vecteurs viraux de virus adéno-associés (AAV), virus connu pour sa propriété de modifier le génome de la cellule hôte. Ainsi, ce vecteur viral étant une version modifiée et non dangereuse pour l'homme du virus (ni ne provoquant de maladie chez l'animal, autre que le changement du génome des cellules infectées) sera injecté de façon intracérébrale dans la zone d'intérêt, ce qui permettra une expression localisée de la protéine d'intérêt, la connexine 30. Sur ces animaux, nous analyserons aussi les activités locomotrices, entre 2 et 3 semaines après l'injection intracérébrale (temps moyen pour une infection optimale mais non nocive pour l'animal), ce qui laisse aussi le temps à l'animal de se remettre pleinement de la chirurgie préalable.

Sur ces 36 mois de projet nous utiliserons un total de 332 souris. Nous analyserons notamment les activités locomotrices des animaux après injections chroniques de cocaïne. Cette chronicité implique un suivi et donc une utilisation optimale des animaux. Ceci permettra de réduire leur effectif tout en minimisant la variabilité inter-animaux. Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisé, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante : (1) Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. (2) Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes. Les animaux seront logés dans

les meilleurs conditions possibles. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience, en particulier après les injections de cocaïne afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie. (3) Ce projet de neurosciences implique une analyse comportementale déjà bien caractérisée chez la souris. Le suivi longitudinal des animaux opérés permettra de réduire le nombre de souris utilisées.

11216 Ce projet s'inscrit dans le cadre du développement de méthodes de diagnostic et de contrôle des infections à mycoplasmes chez les ruminants, causées par *Mycoplasma bovis* et *Mycoplasma agalactiae*. Ces deux bactéries sont des pathogènes majeurs responsables de pathologies graves et de pertes économiques considérables en élevage de ruminants à l'échelle mondiale. Malgré l'importance de ces pathogènes, les méthodes de diagnostic et de contrôle actuelles sont largement insuffisantes. Afin de prévenir ou de lutter contre ces infections, il est important de mieux comprendre les déterminants du pouvoir pathogène de ces bactéries. Les anticorps polyclonaux sont des outils biologiques indispensables à l'étude des protéines exprimées par ces bactéries. A l'heure actuelle, il n'existe pas d'alternative à l'immunisation d'animaux pour la production de réactifs sérologiques (anticorps polyclonaux). Ces réactifs sont classiquement produits chez le lapin, mais lorsque des volumes plus importants de sérums sont nécessaires, le nombre d'animaux peut être réduit grâce à l'immunisation d'ovins. La procédure d'immunisation utilisée respectera les procédures classiques établies pour ces deux espèces animales lors de vaccinations. Le nombre d'animaux nécessaires pour la production d'anticorps polyclonaux est de 2 pour le lapin et 1 pour l'ovin. Un total de 16 protéines sera utilisé pour la production d'anticorps polyclonaux au cours de la période d'étude (5 ans). Le nombre d'animaux initialement prévu pour l'ensemble de l'étude est de 16 lapins (8 protéines) et de 8 ovins (8 protéines) ; toutefois, 2 lapins et un ovin supplémentaires pourront être immunisés en cas de problème (mortalité ou euthanasie pour des raisons non liées à l'immunisation). Le protocole d'immunisation et les prélèvements sanguins sur l'animal vivant ne génèrent pas de souffrance chez l'animal. Les animaux seront hébergés dans le respect des normes spécifiées par le décret 2013-118 du 1er février 2013. L'eau et les aliments seront fournis sans restriction. La manipulation des animaux sera réalisée par du personnel qualifié et un suivi clinique sera réalisé par le vétérinaire responsable de l'étude.

11217 La lymphomagenèse gastrique ou Lymphome gastrique de type MALT est une maladie rare chez l'homme.

Elle est la conséquence d'une infection de l'estomac par des bactéries du genre *Helicobacter*, et survient dans moins de 1% des sujets infectés, majoritairement après l'âge de 50 ans.

Cette maladie est associée à une inflammation de l'estomac favorable à l'infiltration de la muqueuse par des lymphocytes majoritairement B détruisant les cellules épithéliales gastriques.

Cette réponse inflammatoire est initiée par l'infection par *Helicobacter* chez un hôte avec probablement des facteurs de susceptibilité prédisposant à cette maladie.

Il est impossible de pouvoir travailler à partir de prélèvements humains car ils sont rares et difficilement prévisibles.

La modélisation en modèle de souris de cette maladie est une option indispensable pour en comprendre les mécanismes d'apparition.

Un modèle existe basé sur des infections par des bactéries du genre *Helicobacter* dans des souris C57BL6 transgéniques pour la forme humaine de la cytokine APRIL (C57BL6-Tg APRIL). Cette lignée n'a pas de phénotype délétère.

Des données récentes d'étude du microbiote digestif dans ce modèle suggère que l'infection par *Helicobacter* module la quantité d'une bactérie naturellement présente dans le tube digestif qu'est *Escherichia coli*. Cette augmentation au niveau digestif de *E. coli* est accompagnée par l'apparition d'une co-infection gastrique *Helicobacter/E. coli*.

Nous posons l'hypothèse que ces co-infections *Helicobacter/E. coli* favorisent l'apparition de cette maladie.

Nous souhaitons le démontrer dans ce projet grâce au modèle C57BL6-TgAPRIL.

Le principe de cette étude est donc d'infecter des souris par *Helicobacter*, *E. coli* ou les deux ensembles puis d'évaluer la fréquence d'apparition de lymphome post-infection.

La méthode d'infection se fait par gavage, elle est peu invasive et peu douloureuse pour l'animal.

L'apparition de la maladie ne provoque aucun effet délétère chez la souris. C'est une maladie indolente qui reste localisée à l'estomac.

Nous souhaitons tester différentes souches de *E. coli* possédant la capacité de coloniser l'estomac de souris.

En matière de raffinement, la souffrance ou la détresse animale sera prise en compte de la naissance jusqu'à leur mort (hébergement adapté et enrichissement dans les cages). Les animaux seront surveillés par l'expérimentateur durant le déroulement des procédures et les autres jours par les zootechniciens en charge de leur soin et hébergement.

En ce qui concerne la réduction des animaux, nous combinerons les lots témoins.

Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux car malheureusement l'infection par *Helicobacter* est trop complexe pour être entièrement modélisée *in vitro* ou *in silico* car les acteurs cellulaires et moléculaires menant au lymphome gastrique sont extrêmement nombreux.

Ce projet va durer au maximum 5 années. En tenant compte des différents groupes expérimentaux à constituer, nous estimons à 100 le nombre de souris nécessaires.

11218 Une grande partie de l'arsenal thérapeutique utilisé pour traiter le diabète de type 2 (DT2) n'est pas si connectée avec une compréhension réelle du processus de la maladie, même s'il est efficace. La metformine est le médicament le plus recommandé pour le DT2 par son puissant effet sur la diminution de la glycémie, mais ses mécanismes d'action sont encore peu connus. Des résultats récents impliquent l'intestin comme une des cibles importantes de la metformine. En effet, le traitement oral à la metformine provoque une plus grande diminution du glucose dans le sang par l'augmentation de la sécrétion de la molécule GLP-1, la réabsorption d'acides biliaires, les changements dans la composition du microbiote intestinal et une augmentation de la captation de glucose.

Dans ce sens, nous pensons que l'hormone GLP1 est essentiel et qu'il déclenche le reste des effets, et justement la diminution de l'absorption de glucose depuis l'intestin.

Par conséquent, nous proposons d'explorer les effets physiologiques de la metformine sur l'absorption intestinale du glucose radio-marqué au fluor dans des modèles animaux. Dans notre étude, l'imagerie (TEP) sera utilisée afin de suivre en temps réel le processus d'absorption du glucose alimentaire *in vivo*, du tractus gastro-intestinal vers les différents organes périphériques. Les résultats obtenus ici apporteront une nouvelle compréhension du processus de l'effet de la metformine dans l'absorption intestinale du glucose.

Cette information est utile pour :

-décrire un mécanisme d'action qui peut expliquer l'effet aigu du médicament sur la réponse du glucose.

-Suggérer une autre façon d'administrer la metformine au niveau de la pratique clinique

-l'évaluation directe de l'activité intestinale dans le phénotype diabétique

Nous prévoyons d'utiliser au maximum 90 rats, 60 souris et 40 minipigs. Les différentes manipulations seront effectuées chez les animaux selon les principes des 3R : 1.) Réduction : le nombre d'animaux a été réduit à la plus petite quantité possible après l'application des formules statistiques pour obtenir des résultats significatifs. 2.) Remplacement : dans l'évaluation des effets de l'absorption intestinale du glucose, le modèle le plus approprié est le modèle *in vivo* 3.) Raffinement : l'ensemble des procédures sera fait par du personnel formé, les animaux traités avec soins (traitement de la douleur lors du suivi, anesthésie).

11219 La résistance aux antibiotiques est considérée comme une menace majeure pour la santé humaine et animale. Pour diminuer l'apparition de ces résistances tout en conservant un effet thérapeutique des antibiotiques, une stratégie consiste à utiliser des antibiotiques à spectre étroit, par opposition aux antibiotiques à spectre large, avec des schémas posologiques appropriés.

L'amoxicilline présente alors un intérêt chez le chat car c'est un des antibiotiques avec le spectre le plus étroit développé pour cette espèce en Europe. Cependant, pour que l'antibiotique soit efficace, il est important de s'assurer que les concentrations plasmatiques atteintes après le traitement sont suffisantes pour soigner l'animal. Le peu de données existantes montrent que les concentrations plasmatiques atteintes chez certains chats avec les traitements aux doses préconisées seraient trop faibles chez une partie de la population féline, ce qui peut conduire à un échec thérapeutique et/ou à la sélection de bactéries résistantes.

Il est alors nécessaire de mieux caractériser la pharmacocinétique de l'amoxicilline chez le chat afin d'optimiser les doses à administrer et d'être en mesure de proposer de nouvelles recommandations de doses.

Pour cela, 8 chats seront utilisés dans ce projet. Ils recevront successivement 5 administrations d'amoxicilline : une administration intraveineuse, une administration par voie sous-cutanée, une administration par voie orale sous forme de comprimés, une administration par voie orale sous forme de pâte, et une administration par voie orale conjointement à de l'acide clavulanique. La voie intraveineuse est une voie de référence pour déterminer la biodisponibilité d'une molécule. Les voies sous-cutanée et orales d'amoxicilline seule correspondent aux formulations ayant une autorisation de mise sur le marché chez le chat. Enfin, l'association amoxicilline/acide clavulanique étant fréquemment utilisée par voie orale, la 5ème administration permettra de déterminer si la cinétique de l'amoxicilline est modifiée quand les deux molécules sont administrées ensemble. Des prises de sang seront réalisées après chaque administration pour déterminer la cinétique plasmatique de l'amoxicilline après chaque traitement.

Aucune étude statistique n'est prévue, les chats appartenant tous au même groupe. Le nombre de 8 chats a été déterminé en prenant en compte la variabilité interindividuelle potentielle des concentrations plasmatiques.

Il n'est pas possible de se passer d'animaux pour ce projet car le devenir d'un médicament dans un organisme (pharmacocinétique) n'est pas prévisible par des études *in vitro* compte-tenu de la complexité des mécanismes (mécanismes d'absorption, métabolisme hépatique, diffusion tissulaire, élimination rénale). Cependant, en considérant le développement rapide et inquiétant de la résistance aux antibiotiques et le risque important de l'absence future de traitement efficace contre certaines bactéries pathogènes, le rapport bénéfice/risque de l'étude semble justifier l'utilisation d'animaux dans ce projet.

Les chats seront hébergés en groupe avec des arbres à chats, des plateformes et des brosses à disposition. Pour limiter leur stress lors des prises de sang, ils seront entraînés à la manipulation avant la réalisation du projet. Lors des prises de sang, ils seront placés dans une pièce distincte de la salle d'hébergement. En cas de réaction allergique au traitement, une administration de corticoïdes sera réalisée et l'animal sera exclu de l'étude. Si un hématome se forme lors des prises de sang à la jugulaire, la veine ne sera plus prélevée jusqu'à résorption de l'hématome et on utilisera l'autre veine jugulaire. Des poches de glace préalablement réfrigérées permettront également de réduire la douleur en cas d'hématome. A la fin de l'étude, tous les chats seront proposés à l'adoption.

11220 La rétine est soumise à des pathologies neurodégénératives comme la rétinite pigmentaire, ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge qui sont des causes majeures de cécité et restent à l'heure actuelle intraitables. Parmi les différentes stratégies thérapeutiques actuellement développées, notre équipe s'intéresse à la capacité régénérative de la rétine. L'objectif du présent projet de recherche est de mieux connaître les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les processus de régénération de la rétine du xénope afin de trouver des pistes pour réveiller ce pouvoir régénératif chez les mammifères. Dans ce contexte, nous nous intéressons en particulier au facteur YAP qui est connu dans d'autres organes pour sa capacité pro-régénérative. Le xénope est un amphibien

modèle pour l'étude des processus de régénération. En particulier, la rétine de xénope offre un paradigme expérimental privilégié pour l'étude des capacités régénérative des cellules souches rétiniennes *in vivo*. Nous allons utiliser une lignée de xénope permettant d'inhiber l'expression de YAP de manière inductible (par heat shock) chez les têtards. Le maintien de cette lignée sans heat shock ne génère aucun dommage. Nous utiliserons comme modèles de dégénérescence rétinienne soit une lignée inductible conduisant à la mort des photorécepteurs soit un modèle de lésion mécanique. Ces lésions mécaniques étant potentiellement douloureuses, elles sont réalisées sous anesthésie. Les phénotypes de ces animaux sont restreints à la rétine, un organe non-vital et dont la perte totale de fonction n'altère pas la vie des animaux. Nous prévoyons d'utiliser 510 animaux pendant la durée de 3 ans du projet (30 animaux adultes, 240 têtards pré-métamorphiques et 240 post-métamorphiques).

Conformément aux exigences des 3R, les xénopes sont utilisés à minima, sans compromettre les objectifs du projet et tout en permettant une exploitation statistique des résultats. Les conditions d'hébergement se font dans un environnement contrôlé et enrichi. Les points limites sont appliqués dans le respect du bien-être animal, afin de limiter au maximum leur souffrance.

11221 L'obésité et le diabète sont associées à une augmentation du risque de cancer du pancréas mais leur contribution relative dans les phases précoces du cancer du pancréas est peu connue. De plus, contrairement au foie ou au colon, il est impossible de faire des biopsies du pancréas pour vérifier son état ; aussi des méthodes d'analyse non invasive de type Imagerie (dont l'imagerie par résonance magnétique IRM) sont recherchées.

Chez des rats obèses et/ou diabétiques, nous voulons :

- caractériser les différentes phases de l'évolution du cancer du pancréas : de l'infiltration adipeuse à la fibrose puis au cancer,
- développer des outils d'imagerie *in vivo* adaptés pour suivre cette évolution
- tester l'effet de traitements afin de ralentir ou prévenir le cancer du pancréas.

La chirurgie bariatrique est aujourd'hui le seul traitement permettant une perte de poids suffisante sur le long terme et un contrôle des comorbidités induites par l'obésité. La sleeve gastrectomie (SG) qui est une réduction de la taille de l'estomac est actuellement la procédure la plus pratiquée en France et dans les pays occidentaux. Les conséquences de cette opération sur la résolution du diabète sont bien connues, en revanche son effet bénéfique sur le cancer du pancréas lié à l'obésité reste à être démontré.

Nous avons déjà développé un modèle de rat Wistar obèse induit par un régime gras (HFD), qui reproduit le pancréas gras, la pancréatite et les lésions néoplasiques dans le contexte de l'obésité.

Nous avons 2 objectifs :

- 1- comparer l'histologie *ex vivo* et l'imagerie *in vivo* par IRM du pancréas de rats obèses et/ou diabétiques, traités ou non avec de la céruléine (un agent inducteur de la pancréatite)
- 2- comparer l'impact d'un traitement chirurgical de type SG par rapport à un traitement pharmaceutique.

Au final, ce projet nécessitera l'utilisation de 120 rats wistar et 200 rats GK (un modèle de rat diabétique) sur 3 ans. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin du projet.

A terme ce projet pourrait permettre d'identifier et traiter les lésions précancéreuses chez les patients obèses et/ou diabétiques à risque, avant le développement du cancer du pancréas.

Remplacement : Notre projet correspond à un travail de physiologie intégrée qui permettra de comprendre les communications inter-organes et les régulations métaboliques entre l'intestin et le pancréas. Quelques modèles cellulaires, en particulier les organoïdes issus d'intestin ou de pancréas, peuvent permettre d'étudier les communications entre les différents types de cellules au sein d'un organe mais aucun modèle aujourd'hui ne permet de reproduire les interactions inter-organes. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires entrant en jeu.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables et valorisables ou publiables. Un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Ce projet vise à valider de l'imagerie *in vivo* par IRM pour pouvoir réaliser des études longitudinales chez les animaux et ainsi largement réduire leur utilisation.

Raffinement : l'ensemble des procédures de ce projet vise à concilier une interprétation fiable des résultats et le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale et la prise en charge de la douleur est prévue avant pendant et après l'opération. La génération d'une pancréatite par la céruléine peut également engendrer de la douleur que nous traiterons avec des antidouleurs Buprenorphine toutes les 12h si nécessaire. La persistance au-delà de 24h de signaux de souffrance entraînera l'euthanasie de l'animal.

Nous avons inclus dans les procédures des grilles de suivi de poids et de la prise alimentaire des animaux avec des pesées hebdomadaires dès le début du traitement à la céruléine et journalières après la chirurgie. Nous avons défini une grille d'évaluation de la douleur avec des points limites précis.

11222 Certaines malformations cardiaques congénitales ainsi que l'hypertension artérielle pulmonaire (maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons) peuvent conduire à un mauvais fonctionnement (insuffisance) du ventricule droit qui souffre de façon chronique et prolongée d'un excès de charge en pression et/ou en volume. Cette insuffisance cardiaque droite conduit au décès prématuré d'adultes encore jeunes. Le traitement actuel de cette maladie est peu satisfaisant avec une surmortalité de 7.5% chez les 20-30 ans. Ainsi, la découverte de nouveaux traitements apparaît primordiale afin de lutter ou diminuer le développement de cette maladie. Récemment, la thérapie cellulaire a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques en cardiologie et des études expérimentales puis cliniques ont prouvé son efficacité pour améliorer la contraction du muscle cardiaque après un infarctus du myocarde. Cependant, aucune étude n'a été menée sur le ventricule droit défaillant. Avant de tester cette thérapie prometteuse chez les patients, il est crucial d'appréhender au préalable la faisabilité de cette approche, le devenir des cellules implantées et l'efficacité de la thérapie cellulaire sur un modèle animal, ainsi que le risque arythmique associé.

Dans le cadre de ce projet, la prise en compte des 3R est respectée :

- Remplacement : Avant de débiter ce projet, toutes les possibilités de méthodes alternatives (modèles mathématiques ou cellulaires) ont été étudiées. La preuve de concept de l'efficacité de la thérapie cellulaire sur un ventricule droit défaillant nécessite l'utilisation d'un modèle animal avant son application chez l'homme, en effet il n'existe pas de méthode alternative permettant de reproduire les lésions cardiaques engendrées par une surcharge mixte chronique (volumétrique et barométrique) liée à des lésions de la voie d'éjection du ventricule droit. Il n'est donc pas possible de remplacer le modèle in-vivo, qui permet d'avoir une approche physiologique complexe. Concernant les maladies cardiovasculaires, le porc constitue un modèle de choix en santé humaine de par l'existence de caractéristiques et de propriétés anatomiques et physiologiques cardiovasculaires comparables à celles de l'homme.

- Réduction : Avant de débiter cette étude, des expériences sur des cellules puis sur des modèles de rongeurs ont été effectuées afin de réaliser la preuve de concept. Le chercheur responsable est assisté dans sa démarche par des chirurgiens cardiaques afin d'avoir une expertise et de favoriser les procédures non invasives comme l'échographie cardiaque, d'optimiser tous les gestes invasifs et réduire ainsi le nombre d'animaux. Suite à une analyse statistique, le nombre d'animaux qui sera inclus dans ce projet est estimé au maximum à 18 animaux.

- Raffinement : Toutes les mesures de raffinement seront mises en place et ce tout au long du projet. Au niveau de l'hébergement des animaux : locaux agréés, personnes formées et sensibilisées au bien-être des animaux, conditions d'hébergement et d'enrichissement favorisant leur confort (groupe sociaux, jouets, alimentation appropriée notamment) et au niveau des

procédures : mise en place d'une prémédication, anesthésie et analgésie adéquates ainsi que le suivi des constantes des animaux tout au long de la procédure expérimentale.

11223 Le potentiel électrique membranaire constitue le support de l'excitabilité neuronale. Celui-ci est contrôlé par un courant potassique généré par les mouvements d'ion potassium (K⁺) au travers de canaux potassiques. Parmi eux, les canaux K2P constituent une famille importante dont plusieurs membres ont été caractérisés et leurs rôles physiologiques déterminés. Ces canaux présentent un intérêt fondamental pour comprendre le fonctionnement cérébral et constituent des cibles thérapeutiques privilégiées dans le traitement pharmacologique de nombreuses pathologies cérébrales. L'utilisation de souris génétiquement modifiées a permis de comprendre le rôle physiologique de plusieurs de ces canaux ioniques. La présente étude reprend cette stratégie pour la caractérisation fonctionnelle d'un nouveau membre de cette famille de canaux potassiques.

Les études *in vitro* menées jusqu'ici suggèrent que notre canal d'intérêt jouerait un rôle dans de nombreuses fonctions cellulaires (sécrétion, prolifération, expression génique...) et physiologiques, en particulier dans la perception sensorielle mécanique et thermique. Ces données nécessitent à présent d'être confirmées *in vivo*, à l'échelle d'un organisme entier, ce modèle ne pouvant pas être remplacé en l'état actuel des connaissances.

Ce projet consistera dans un premier temps à caractériser le phénotype global de la lignée de souris chez laquelle le gène codant pour notre canal d'intérêt a été invalidé. Dans un deuxième temps nous testerons plus spécifiquement les capacités sensorielles des souris génétiquement modifiées.

Cette approche a été utilisée pour plusieurs gènes de la même famille sans démontrer de phénotype gravement dommageable pour les souris. Nous ne nous attendons donc pas, pour cette nouvelle lignée, à observer un phénotype gravement dommageable. Néanmoins notre projet est conçu pour prévenir au maximum toute souffrance sur un nombre d'animaux limité au strict nécessaire, conformément à la règle des 3R.

Ainsi, afin de réduire le nombre d'animaux, la quantité nécessaire d'animaux a été déterminée par des calculs de puissance permettant de d'établir le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Par soucis de raffinement, éléments d'enrichissement de milieu (un igloo et carrés de ouate compressée) sont présents dans toutes les cages. Le personnel technique habilité et formé observera les animaux de façon hebdomadaire afin de rechercher des signes cliniques indicateurs des conséquences de l'absence de ce gène sur l'organisme. Pour ce faire une grille de score a été établie permettant d'objectiver et d'identifier précocement tout signe de stress ou de douleur afin d'y répondre par des actions précises incluant la mise en œuvre de points limites adaptés.

174 souris seront utilisées pour ce projet.

11224 Nos recherches portent sur l'action thérapeutique de peptides et de leurs dérivés sur le développement de différents modèles tumoraux, comme par exemple les cancers du sein, les insulinomes, les mélanomes, les cancers colorectaux et les glioblastomes. Ces tumeurs sont caractérisées par un développement rapide, une forte angiogenèse et une résistance à certaines thérapies classiques. Il a été décrit dans ces tumeurs une surexpression de récepteurs membranaires, qui induisent un signal favorisant la progression tumorale. Dans ce cadre, nous avons développé des peptides qui viennent s'insérer dans les membranes, bloquer le récepteur et donc l'induction des signaux de survie et de prolifération des cellules tumorales. Nous avons pu publier l'efficacité de ces peptides dans le cancer du sein et le glioblastome, et notre programme de recherche actuel vise à élargir le nombre de cibles ainsi que les types de cancers agressifs comme ceux de la peau, du colon ou du pancréas. De plus, nous souhaitons poursuivre l'acquisition de connaissances sur les mécanismes d'action des peptides, nécessaire à l'optimisation de la stratégie avec pour objectif d'obtenir des peptides encore plus efficaces, à moindre dose et donc limiter aux mieux tout effet secondaire.

Pour ce faire, nous avons besoin de mettre en place des modèles animaux de ces tumeurs, soit en injectant à des souris des cellules tumorales issues de tumeurs (sein, glioblastome, mélanome,

cancer colorectal) humaines ou murines, soit en utilisant des modèles génétiques développant spontanément des tumeurs. En effet, des tests *in vitro* (remplacer) ont été engagés et apportent déjà un certain nombre de preuves de l'efficacité des peptides, mais sont insuffisants à la démonstration de l'efficacité dans l'organe tumoral, plus complexe, et impliquant plusieurs types cellulaires.

L'utilisation de souris est justifiée par le développement de la biologie moléculaire qui a abouti à la création de nombreux modèles murins génétiquement modifiés, et par l'existence de lignées immuno-compromises (nude) qui autorisent la greffe de cellules tumorales humaines. Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale, et intègre des traitements analgésiques afin de prévenir ou de gérer l'apparition de douleurs. Toute procédure entraînant une souffrance est réalisée sous anesthésie, et des mesures sont prises pour que les animaux ne subissent aucun dommage lors de l'intervention (par exemple en utilisant un tapis chauffant pour éviter la baisse de température). De plus, différents critères ont été établis pour justifier un arrêt de l'expérience en cours : des points limites ont notamment été établis pour éviter toute souffrance animale (Raffiner).

L'objectif est donc d'évaluer l'efficacité de ces peptides mais aussi leur absence de toxicité, seuls ou en association avec des molécules « challengers » déjà utilisées dans les traitements du cancer. Nous espérons ainsi valider des composés moins toxiques aux mêmes doses que les molécules actuellement employées en chimiothérapie, ou à toxicité équivalente, augmenter l'efficacité des traitements déjà en place en les combinant avec nos peptides, en utilisant un nombre minimum de souris, mais permettant d'aboutir à des résultats statistiquement significatifs (réduire).

Pour la totalité de notre étude, nous envisageons l'utilisation maximale théorique de 12750 animaux sur 5 ans, dans le cas où tous nos peptides seraient testés.

11225 D'après l'OMS, le diabète de type II concernait plus de 422 millions d'individus dans le monde en 2014 et ce nombre continue d'augmenter. En 2015, 1,6 million de décès sont directement attribués au diabète de type II et 2,2 millions supplémentaires à l'hyperglycémie (taux de sucre trop important dans le sang).

Les personnes souffrant de diabète de type II font face à une diminution de leur qualité de vie et elles présentent des risques augmentés de survenue d'accidents cardiovasculaires. Des mesures hygiéno-diététiques comme une prise en charge nutritionnelle adaptée couplée à une activité physique sont des mesures efficaces de prévention de ces maladies. Le recours à des médicaments comme la metformine sont des mesures complémentaires à ces mesures hygiéno-diététiques lorsque la maladie a atteint un stade plus avancé. L'utilisation d'extraits végétaux en complément des mesures hygiéno-diététique est également une piste sérieuse pour la lutte contre l'obésité et le diabète de type II. Certains extraits végétaux issus de la pharmacopée européenne ont déjà montré des effets bénéfiques et protecteurs sur le microbiote intestinal et pourraient permettre d'améliorer la qualité de vie et de diminuer les facteurs de risques de développer un diabète de type II.

L'objectif de ce projet est d'étudier les bénéfices apportés par différentes formulations innovantes d'extraits végétaux sur la prévention et le développement du diabète de type II chez le Hamster et de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces extraits végétaux.

Chez le hamster, il est possible d'induire un état de prédiabète en nourrissant les animaux avec un régime riche en graisse et en sucres (mimant les mauvaises habitudes alimentaires impliquées en partie dans le développement du diabète de type II chez l'homme) durant plusieurs semaines. Le hamster présente l'avantage d'avoir un métabolisme des lipides plus proche de celui de l'Homme que d'autres modèles de rongeurs comme le rat ou la souris.

Ce projet de type nutritionnel nécessitera l'utilisation de 70 hamsters sur une durée de 3 ans. Ce nombre est choisi de manière à obtenir les réponses attendues en ayant recours à des effectifs les plus petits possibles. Pour cela le projet se base sur la littérature scientifique existante, utilise des outils de calcul statistique (a priori et a posteriori) et privilégie les méthodes non terminales permettant les suivis longitudinaux des animaux. Les modèles *ex vivo*, *in vitro* et *in silico*, bien que très utiles sur certains aspects et indispensables au principe de remplacement, ne permettent pas

encore d'obtenir une approche globale aussi complexe que celle du diabète et de l'obésité chez un mammifère, pour approcher au plus près de la réalité retrouvée chez l'homme. Pour obtenir une approche globale dans ce projet, l'utilisation d'un modèle murin de petite taille est cependant privilégiée aux plus grandes espèces susceptibles de ressentir de la douleur sur une plus longue période. Au cours de ce projet, les animaux seront placés dans un environnement adapté à leurs besoins physiologiques et observés quotidiennement sur la base de critères comportementaux (posture, appétit, interaction avec l'environnement...) et morphologiques (croissance, prise de poids, état général des dents, du poil...) pour prévenir au plus vite de la diminution de leur état de bien-être. Les différents tissus obtenus au cours de ce projet seront stockés pour permettre des analyses ultérieures et éviter de devoir recourir à un projet similaire dans le temps.

L'ensemble de ces dispositions favorisent le principe de réduction, raffinement et remplacement de l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques.

11226 Les maladies atopiques, incluant la dermatite atopique (également appelée eczéma), l'asthme, la rhinite allergique et les allergies alimentaires, sont des maladies inflammatoires complexes, impliquant différents sites du corps, avec des caractéristiques communes. Le terme "marche atopique" fait référence à la séquence naturelle des manifestations atopiques, qui montre que la dermatite atopique précède le développement des autres maladies atopiques, et que la sévérité de la dermatite atopique influence le cours de l'allergie respiratoire. Une meilleure compréhension des mécanismes de la marche atopique est cruciale afin de développer des stratégies de préventions et de nouveaux traitements des maladies atopiques.

Nous avons mis au point dans notre laboratoire un modèle mimant les caractéristiques de la marche atopique chez la souris. Dans ce modèle, nous utilisons une technologie permettant de générer des micropores dans la peau (technique également utilisée chez l'Homme dans la sphère médicale) puis nous appliquons un allergène (l'ovalbumine) sur la peau de souris. Cette étape engendre une dermatite atopique liée à une réponse immunitaire caractéristique des allergies, et provoque une sensibilisation de la souris à l'ovalbumine. Nous avons la possibilité de modifier la profondeur des micropores, ce qui nous permettra de mimer différentes sévérités de dermatite atopique. Pour cette étude, nous étudierons 4 niveaux de sévérité qui génèrent des réponses immunitaires et inflammatoires différentes. Deux semaines après le début de la sensibilisation, nous allons réexposer les souris à l'ovalbumine au niveau des poumons, ce qui va entraîner une réponse allergique similaire à un phénomène asthmatique. Ce protocole sera appliqué à 11 lignées de souris génétiquement modifiées permettant de caractériser le rôle de différentes cellules et de différents gènes. Une analyse des paramètres de la réaction immunitaire au niveau de la peau et au niveau des poumons sera effectuée à la fin du protocole, afin de mieux comprendre les mécanismes de la marche atopique.

Remplacement : Les lignées de souris génétiquement modifiées utilisées dans ce projet vont nous permettre d'inactiver certaines cellules ou certains gènes, dont l'implication dans la réponse immunitaire allergique a été suggérée *in vitro* par d'autres équipes de recherche. De plus, les expériences menées précédemment dans notre laboratoire ont permis d'élaborer un modèle *in silico* prédisant un rôle de ces cellules et gènes dans la sensibilisation aux allergènes. Néanmoins, les phénomènes à l'œuvre dans la marche atopique mettent en jeu différents organes et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour confirmer ces résultats, pour comprendre les processus responsables de la marche atopique et pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Réduction : Ce protocole sera appliqué à un total de 11 lignées de souris génétiquement modifiées afin d'identifier les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaire. Afin de diminuer la variabilité des résultats, des souris de fonds génétiques purs seront utilisées. Pour chaque lignée, 10 animaux modifiés seront comparés à 10 animaux contrôles pour les 4 niveaux de sévérité de dermatite atopique. Pour cette étude, un nombre maximal de 800 souris sera utilisé. Cet effectif nous permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différents paramètres mesurés, et de conclure quant au rôle des cellules et des signaux cellulaires étudiés dans la marche atopique. Des stratégies expérimentales seront mises en place dans le but de

diminuer le nombre d'animaux. Par exemple, les lignées chez lesquelles des gènes d'intérêts sont inactivés dans tout l'organisme seront étudiées en premier. Uniquement dans le cas où un rôle de ces gènes dans la marche atopique est mis en évidence, des lignées chez lesquelles ces gènes sont inactivés dans des cellules spécifiques seront étudiées, afin d'identifier les cellules du système immunitaire impliquées dans ce phénomène.

Raffinement : La rupture de la barrière épidermique par génération de micropores est peu douloureuse, notamment comparée à la méthode classique utilisée précédemment au laboratoire. L'application topique de l'ovalbumine et l'instillation intra-nasale de l'ovalbumine nécessitent une anesthésie gazeuse légère et une anesthésie générale légère respectivement. Après ces manipulations, les animaux seront placés sur une plaque chauffante et seront surveillés jusqu'au réveil. Tout au long du protocole, la surveillance des animaux aura lieu deux fois par semaine durant la phase de sensibilisation, et tous les jours durant la phase de réexposition à l'ovalbumine au niveau des poumons par instillations intra-nasales. La surveillance sera visuelle, avec un suivi de l'aspect général de l'animal, de sa posture et de son comportement. Si l'animal présente un dos voûté, un pelage hérissé, est inactif après stimulation, ou si les points d'injections présentent des signes d'infection ou d'inflammation, il sera retiré de l'étude et pourra bénéficier de soins après l'avis du vétérinaire. Si le cas est plus grave (blessure importante par exemple), l'animal sera euthanasié immédiatement.

11227 Le diabète de type 2 (DT2) est la forme la plus fréquente de diabète (90 % des cas). Il se manifeste généralement à l'âge adulte, chez des individus de 40 ans et plus. Chez certaines personnes atteintes de DT2, la production d'insuline par les cellules du pancréas est insuffisante. Chez d'autres, l'insuline produite n'accomplit pas bien son travail ; on parle alors de résistance à l'insuline. Dans les deux cas, le résultat est une augmentation du taux de sucre dans le sang (hyperglycémie), car le corps utilise mal le glucose (sucre) comme source d'énergie. Cette hyperglycémie chronique entraîne de nombreuses complications telles que des maladies cardiovasculaires, des accidents vasculaires cérébraux, la cécité, l'insuffisance rénale et des lésions nerveuses. Les causes du diabète de type 2 sont nombreuses et, dans bien des cas, c'est la combinaison de plusieurs facteurs qui déclenche l'apparition de la maladie. Depuis les années 2000, des équipes de recherche ont mis en évidence une inflammation chronique chez les patients atteints de DT2. Toutefois, les mécanismes à l'origine de cette inflammation restent mal connus.

Notre système immunitaire a évolué afin de maintenir l'équilibre et la fonction des tissus en réponse à l'inflammation. Ainsi, notre organisme est surveillé par des récepteurs capables de détecter des signaux de danger. Les protéines « cGAS » et « AIM2 » sont des composantes du système immunitaire qui sont capables de détecter la présence de ces signaux et de déclencher l'inflammation. D'après les données de la littérature et nos données du laboratoire, nous émettons l'hypothèse que ces deux protéines pourraient être impliquées dans l'inflammation chronique liée au DT2.

Dans le cadre de notre projet, nous utiliserons des modèles de souris génétiquement modifiées, dans lesquels les gènes codant pour les protéines « cGAS » et « AIM2 » sont invalidés. Nous travaillerons également avec un modèle dans lequel les 2 gènes sont invalidés.

Nous utiliserons 2 modèles de diabète distincts :

1. Les souris seront soumises à un régime enrichi en graisse. Ce régime entraîne une obésité et les mêmes changements métaboliques que l'on peut rencontrer durant le stade pré-diabétique chez l'Humain.

2. Le 2ème modèle utilisé est une approche génétique. Les souris dont les gènes codant pour les protéines « cGAS » et « AIM2 » sont invalidés seront croisées avec une lignée de souris (ob/ob) dont le gène codant pour la leptine (hormone de la satiété) a été invalidé. Les souris ob/ob ont la particularité de développer une obésité précoce et un diabète à l'âge de 6-8 semaines. Par conséquent, ces souris sont un excellent modèle pour étudier le DT2 à un stade avancé.

Ces modèles animaux nous permettront d'approfondir la compréhension du rôle de ces protéines dans l'inflammation chronique au cours du DT2. Pour ce faire, les paramètres métaboliques des souris (tolérance au glucose et à l'insuline, paramètres sanguins) seront déterminés.

Remplacement : La régulation de la glycémie nécessite la participation de plusieurs organes interdépendants (foie, îlots de Langerhans du pancréas, muscles, tissus adipeux, cerveau). Ces mécanismes complexes ne sont présents que dans des organismes complexes tels que la souris.

Réduction : Nous utiliserons un total de 312 animaux. Le nombre d'animaux testés dans chaque expérience nous permettra une comparaison statistique adaptée entre les différents groupes tout en tenant compte des impératifs de réduction. Par ailleurs, toujours par souci de réduction, plusieurs procédures expérimentales (avec un temps de récupération adapté pour les animaux) seront réalisées sur les mêmes cohortes de souris.

Raffinement : Les différentes expériences seront réalisées par du personnel qualifié afin d'éviter le stress lié à la manipulation des animaux. Les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum nécessaire pour les analyses biochimiques et les volumes injectés seront adaptés au poids de chaque animal afin de ne pas induire de stress supplémentaire. Une attention particulière sera portée aux souris ob/ob qui développent un diabète précoce. Sachant que l'une des conséquences directes du diabète chez ces souris est l'augmentation des mictions, un suivi quotidien de l'état de la cage sera réalisé. Les techniciens devront changer la cage dès que nécessaire en limitant au maximum d'impacter le bien-être des souris.

11228 L'objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel thérapeutique d'une molécule de synthèse sur les troubles comportementaux observés dans le syndrome de l'X fragile (FXS). En effet, il a été montré que le syndrome neurodéveloppemental était en partie dû à une altération des canaux BKCa et que le BMS204352, un activateur de ces canaux, pouvait atténuer certains de ces effets. Néanmoins ce potentiel doit être confirmé par des expériences de traitement chroniques à différents stades du développement. Nous proposons donc d'étudier les effets chroniques du BMS 204352 sur un modèle murin génétiquement modifié du syndrome de l'X fragile, la souris FmR1-KO qui ne présente pas de phénotype dommageable. Le traitement sera réalisé chez des souris adolescentes, adultes jeunes et adultes âgées afin d'évaluer l'importance de la durée de la présence des troubles (perturbations récentes vs perturbations installées depuis longtemps) et à des âges auxquels il se produit de multiples remaniements neurobiologiques rendant l'organisme particulièrement vulnérable (puberté, vieillissement). Nous évaluerons les effets du traitement à court terme et à long terme.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, les mêmes animaux seront utilisés pour l'ensemble des tests de chaque expérience. Néanmoins, aucune solution de remplacement n'est possible lorsque l'on s'intéresse aux effets comportementaux. Afin de limiter au maximum le stress des animaux, une habituation à l'expérimentateur par manipulation quotidienne légère est réalisée. Un seul expérimentateur manipule les animaux pendant toute la durée de l'expérience. Les animaux ont du matériel de nidification dans la cage changé régulièrement (à chaque changement de litière) à disposition. Afin de conserver les relations sociales des animaux et de réduire le stress lié à l'isolement, les animaux sont hébergés à 4 par cage. Aucun des tests comportementaux n'est invasif, douloureux ou ne nécessite de privation alimentaire ou hydrique. Néanmoins, les animaux sont habitués à la pièce expérimentale et au dispositif. Tout ceci diminue le stress des animaux et améliore la fiabilité des tests comportementaux.

Etant donné la variabilité interindividuelle existant dans le comportement des souris un effectif par groupe de 12 animaux au moins est nécessaire donc 48 animaux (effet génotype et effet traitement). Les expériences sont réalisées à 3 âges différents ($48 \times 3 = 144$) pour 2 expériences soit 288 animaux. IL faut également prévoir des souris congénères pour les tests sociaux qui sont utilisées sur plusieurs expériences en parallèle, soit 120 femelles). Soit un total de 408 souris.

11229 Ce projet vise à déterminer le rôle des monocytes/macrophages dans le processus de régénération tissulaire et vasculaire d'un tissu lésé par exposition aux rayonnements ionisants. Cette étude aborde d'une part les mécanismes fondamentaux de compréhension des monocytes/macrophages

et d'autre part l'interaction de cette population cellulaire avec une stratégie thérapeutique basée sur l'injection d'exosome.

L'exposition à de fortes doses d'irradiation entraîne une raréfaction vasculaire et le développement d'une fibrose. La modulation de l'inflammation pourrait limiter la mise en place et le développement de cette pathologie. Le modèle animal utilisé est la souris qui est un modèle de référence pour les études précliniques. Dans le but d'évaluer l'effet physiologique et thérapeutique des injections de cellules souches et leurs dérivés sur un type de lésion radique (modèle d'irradiation localisée à la patte), nous sommes dans l'obligation d'utiliser un modèle *in vivo*.

Pour ce projet, le nombre estimé d'animaux est de 642.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, ce protocole expérimental est établi avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale. Lors de l'observation quotidienne des animaux une attention particulière sera portée à la zone lésée. Différents paramètres fonctionnels seront mesurés par les techniques non invasives pour évaluer la régénération tissulaire et vasculaire. D'autres analyses seront réalisées sur des prélèvements faits sur animal euthanasié.

11230 L'objectif global de notre projet est de contribuer à la compréhension des processus d'encodage et de stockage des mémoires chez les mammifères. Plus spécifiquement, nous souhaitons étudier les mécanismes sous-jacents à la formation de la mémoire à long terme dans une zone spécifique du cerveau. Cette zone du cerveau a été impliquée dans plusieurs maladies humaines. Une meilleure compréhension de son fonctionnement en conditions normales est nécessaire afin d'identifier et de comprendre les altérations, qui se manifestent en conditions 'anormales', telles que les maladies neuro-développementales ou neuro-dégénératives. Notre approche innovante consiste à marquer les cellules activées lors d'une tâche comportementale. Ce marquage permet l'identification des cellules, jouant un rôle clé dans la réalisation de cette tâche. Nous étudierons ensuite les propriétés et caractéristiques de ces neurones, afin d'élaborer une signature ou « carte d'identité » de ces neurones. Nous proposons ensuite de manipuler l'activité de ces neurones, afin de confirmer leur rôle dans la performance mnésique liée à cette tâche. L'utilisation d'un modèle animal, plus particulièrement la souris, est indispensable pour la réalisation de ce projet important : 1) notre projet vise à comprendre les mécanismes sous-jacents à la formation et au stockage de la mémoire. Pour cela, l'utilisation de systèmes complexes et entiers est absolument nécessaires. Le remplacement par les méthodes *in silico*, *in vitro*, ou l'utilisation d'animaux de plus faible sensibilité ou éventuellement par la recherche sur l'homme n'est pas possible à ce jour. Même si les modèles comportementaux existent chez des animaux de plus faible sensibilité, ils ne sont pas adaptés à notre étude, car ces modèles *in vivo* ne possèdent pas la structure du cerveau concernée par notre étude. 2) Notre projet nécessite un système de marquage permettant l'identification des neurones impliqués. Pour ces raisons techniques, un modèle transgénique est nécessaire. A ce jour, la souris est le seul mammifère pour lequel le génome soit facilement modifiable, un critère essentiel pour le développement du modèle utilisé dans notre travail. Nous avons réfléchi les expériences de façon à respecter au maximum la règle des 3Rs : remplacement (mentionné ci-dessus), réduction et raffinement. Réduction : nous avons réduit à minima le nombre d'animaux impliqués dans cette étude. Le nombre d'animaux maintenu est celui nécessaire pour assurer l'exploitation statistique de nos résultats. Nous estimons que le nombre d'animaux requis pour la réalisation de ce projet essentiel sera de 1015 animaux (pour la durée du projet sur 5 ans). Raffinement : les animaux seront hébergés de façon adaptée à leurs besoins et recevront une surveillance quotidienne et les soins adaptés. Nous avons également intégré plusieurs mesures/stratégies pour éviter l'angoisse ou la souffrance et pour assurer le confort et le bien-être de l'animal (par exemple : l'habituation à l'expérimentateur et à la manipulation, la pesée quotidienne, la définition de points limites précoces adaptés à l'expérience et des mesures conservatoires). Plusieurs raffinements scientifiques sont également prévus afin de récolter un maximum de données scientifiques pour chaque souris. Le bénéfice attendu de notre projet est une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents

les processus cognitifs, et, à long terme, de comprendre comment ces processus normaux peuvent être perturbés dans les conditions pathophysiologiques.

11231 Les hypoxies périnatales correspondent à une inadéquation entre les apports et la demande tissulaire en dioxygène (O₂) survenant au cours d'une période qui s'étend de la fin du développement fœtal jusqu'à 8 jours après l'accouchement. Fréquentes et de causes diverses (enroulement du cordon ombilical, retard de respiration aérienne, apnée du nourrisson,..), elles ont une incidence sur la mise en place de différents organes, et plus particulièrement du système nerveux central, plus gros consommateur d'O₂ et d'énergie de l'organisme. Ainsi les hypoxies périnatales seraient responsables d'environ 25% des problèmes neurodéveloppementaux chez l'enfant, incluant des retards psychomoteurs, des déficits sensoriels ou des défauts d'apprentissage.

Si les impacts de l'hypoxie périnatale sur le cerveau ont été largement étudiés et sont aujourd'hui majoritairement connus, les données de la littérature indiquent que le cervelet pourrait lui aussi être une cible privilégiée de cette pathologie. En effet, s'agissant d'une structure immature à la naissance, le cervelet est particulièrement sensible et vulnérable à des troubles périnataux de l'oxygénation. De plus, il existe une forte corrélation entre la majorité des défauts cognitifs et moteurs observés chez les enfants touchés par une hypoxie périnatale et les fonctions contrôlées par le cervelet.

L'objectif de cette étude est donc de i) définir la période périnatale à laquelle le cervelet est le plus vulnérable au manque d'O₂, ii) déterminer les altérations histologiques du cervelet induites par une hypoxie périnatale, iii) mettre en évidence les éventuels impacts comportementaux liés à ces déficits et iv) comparer les déficits cérébelleux observés lors d'une hypoxie continue (mimant l'enroulement du cordon ombilical autour du cou du nourrisson ou un retard dans le déclenchement de la respiration aérienne à la naissance) à ceux provoqués par une hypoxie intermittente telle que l'apnée du nourrisson.

La localisation très postérieure et la résolution spatiale limitée des techniques d'imagerie actuelles rendent l'étude du cervelet extrêmement difficile *in vivo* chez l'homme. Pour la réalisation de ce projet, notre choix s'est tourné donc vers le modèle animal murin pour deux raisons majeures ; 1/ le développement du cervelet de la souris se déroule essentiellement après la naissance, ce qui en facilite l'étude, et 2/ la première semaine postnatale chez la souris correspond, au niveau de la mise en place du cervelet, à la période périnatale chez l'homme, ce qui favorise l'extrapolation des résultats. La souche de souris C57Bl6 a par ailleurs été privilégiée car la plus communément utilisée pour les études comportementales. La période à laquelle le cervelet est le plus sensible à l'hypoxie sera déterminée en étudiant différents stades postnatals, à savoir P6 (mise en place des couches cérébelleuses), P12 (établissement des connexions synaptiques), P21 (fin du développement cérébelleux) ainsi que les effets à court terme (t0 et t+6h), moyen terme (t+24h) et long terme (t+6j et t+15j voire 2 mois pour les tests comportementaux). Pour chacune de ces étapes développementales, l'apparition d'un stress oxydatif et son impact sur les différents mécanismes cellulaires impliqués dans la mise en place du cervelet (apoptose, prolifération, migration, connexions synaptiques) seront analysés ainsi que leur implication dans des déficits comportementaux. Le nombre d'animaux nécessaire à cette étude est ainsi estimé à 30 mères avec 198 portées de 6 souriceaux (soit 1218 animaux) pour une étude d'une durée de 3 ans. Les souris seront séparées en 2 lots, un lot normoxique (contrôle) et un lot hypoxique contenant chacun 12 animaux par analyse, afin de limiter les écarts liés à la variabilité individuelle des animaux et obtenir des résultats statistiquement exploitables.

La durée de la phase d'hypoxie est fixée à 40 minutes (temps le plus couramment utilisé dans les protocoles d'hypoxie longue) mais pourra être ajustée en fonction de la souffrance animale lors des premiers tests. Lors de la procédure d'hypoxie, la mère sera retirée de la cage et seuls les souriceaux seront placés dans la chambre d'hypoxie dans leur cage d'origine pour réduire le stress du changement d'environnement. Un coussin chauffant sera positionné sous la cage afin de limiter la variation de la température corporelle des souriceaux. Le comportement des animaux sera surveillé pendant et après le protocole d'hypoxie et une grille décisionnelle d'arrêt ou de diminution

de temps d'hypoxie a été établie afin de limiter une éventuelle souffrance de l'animal sans induire une augmentation de l'effectif.

A terme, cette étude nous permettra de déterminer l'ampleur des différentes lésions cérébelleuses ainsi que leurs conséquences développementales afin d'améliorer la prise en charge des nourrissons après la survenue d'un épisode hypoxique.

11232 Le prolapsus de la Valve cardiaque Mitrale (PVM) affecte 1 personne sur 40 après 60 ans. Il peut se manifester par une régurgitation du sang du ventricule vers l'oreillette gauche lors de la systole ventriculaire et se traduire par une insuffisance cardiaque qui nécessitera in fine une intervention chirurgicale qui reste la seule voie thérapeutique. Malgré les progrès réalisés dans la chirurgie valvulaire, les risques chez les sujets âgés restent importants et il est donc impératif de trouver d'autres voies thérapeutiques et donc d'identifier les mécanismes physiopathologiques à l'œuvre qui restent à ce jour largement méconnus. Le PVM a longtemps été considéré comme une pathologie dégénérative du sujet âgé cependant des bases génétiques héréditaires sont maintenant clairement établies. Nos récents travaux de recherche clinique et de génétique ont identifié plusieurs mutations perte de fonction dans le gène ARHGAP24 chez des patients atteints de valvulopathie. ARHGAP24 code pour la protéine FilGAP qui est régulateur de la petite GTPase Rac1.

Malgré l'avancée des connaissances les mécanismes physiopathologiques impliqués restent méconnus faute de modèle animal récapitulant le phénotype des patients. C'est pourquoi nous nous proposons d'analyser en détail le phénotype cardiaque valvulaire de souris transgéniques invalidées pour le gène ARHGAP24.

Le projet se propose d'étudier ce modèle transgénique par une étude longitudinale sur des individus atteints tout au long de leur vie et une étude du développement de la pathologie au cours de l'embryogénèse par prélèvement d'embryons sur femelles gestantes. Au total, 99 animaux seront utilisés.

Le projet a été pensé selon les 3R par :

- Réduction du nombre d'animaux utilisés grâce une méthode d'imagerie non invasive, l'échographie, qui permet d'étudier la valvulopathie sans avoir à euthanasier l'animal.
- Remplacement : Les mécanismes moléculaires ont été analysés au préalable *in vitro*. A l'heure actuelle, aucune technique ni modèle *in vitro* ne peut mimer un défaut de valvulogénèse et la progression de la pathologie.
- Raffinement : les animaux sont hébergés en groupe avec un enrichissement adapté. L'échocardiographie est une technique non invasive et indolore il n'y a pas de douleur attendue nécessitant l'utilisation d'analgésique. Pour limiter l'angoisse des animaux pendant l'examen échocardiographique, l'anesthésie sera induite par un mélange d'isoflurane. A la fin de l'étude, les souris maintenues sous anesthésie à l'isoflurane pendant leur dernière échographie seront euthanasiées.

11233 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence fronto-temporale (DFT) sont deux maladies neurodégénératives fatales qui restent actuellement incurables. Le risque de développer ces maladies au cours de la vie est de 1/1000. Des analyses anatomopathologiques ont montré que les patients souffrant de la SLA et DFT présentent trois types d'inclusions protéiques impliquant les protéines TAU, TDP-43 ou FUS. Des mutations dans les gènes codant pour TDP-43 et FUS sont associées à des formes familiales de SLA, tandis que des mutations de TAU sont associées à des cas familiaux de DFT. TDP-43 et FUS sont des protéines de liaison à l'ARN qui régulent les différentes étapes du métabolisme de l'ARN, de la transcription au transport subcellulaire. TAU est une protéine du cytosquelette impliquée dans la structure des microtubules. Le but de cette étude est de caractériser comment les gènes codant pour les protéines TAU, FUS et TDP-43, tous trois centraux dans la SLA et la DFT, sont en relation pour provoquer ces maladies. Nous allons utiliser un nouveau modèle de souris transgéniques qui exprimera à la fois les protéines FUS (souris Delta NLS) et TAU (Souris Tau h/h pour double allèle humanisé) mutées et déterminerons les synergies éventuelles entre ces mutations. Etant donné les mécanismes étudiés ainsi que leur intégration

dans des systèmes anatomiques complexes, il n'est pas possible de remplacer le modèle murin par des modèles *in silico* ou *in vitro*. Les techniques que nous utiliserons pour avancer dans ce projet sont déjà mises au point et utilisées de manière courante dans notre laboratoire. Elles sont donc raffinées. Ces souris ne présentent que des problèmes moteurs légers. Afin de nous assurer du bien être des souris lors de la procédure, les signes suivants seront recherchés quotidiennement : aspect général, la position des oreilles, la réduction de l'appétit entraînant une perte de poids, les blessures sévères, les tumeurs. Nous observerons aussi si la souris est capable de se remettre sur ces pattes lorsqu'elle est placée sur le dos (en moins de 15 secondes). Dans la perspective du respect de l'approche des 3 R, nous avons de plus réduit le nombre de souris utilisé. Nous proposons d'utiliser un total de 236 souris.

11234 La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à champ cyclique rapide (FFC-NMR) est une technologie émergente en physique. Son principe est d'étudier les phénomènes biologiques à des champs magnétiques très faibles sur des machines qui aujourd'hui sont à l'état de prototypes prometteurs.

Le but de ce projet européen est de tester la sensibilité et l'utilité de cette nouvelle méthode pour l'étude de mécanismes moléculaires physiopathologiques, invisibles par la RMN standard.

L'hypothèse émise est que la RMN à champ cyclique rapide peut aider à délimiter le tissu sain du tissu pathologique, et présenter un intérêt diagnostique.

Cette étude permettra de tester la RMN à champ cyclique dans le contexte de l'étude des tumeurs cérébrales. En l'absence de modèle alternatif, l'utilisation de 318 souris Nude permettra de modéliser la complexité des tumeurs humaines et de fournir l'ensemble des tissus pour une analyse extensive (cerveaux et pattes de souris). Nous espérons apporter grâce à la RMN à champ cyclique des informations plus précises sur la délimitation des tumeurs et sur leur hétérogénéité tissulaire.

De plus, différents agents de contraste expérimentaux seront testés pour évaluer le gain de performance qu'ils peuvent apporter.

Dans le respect de la règle des 3R, tous les efforts seront faits par les expérimentateurs pour réduire le nombre d'animaux impliqués (réduction) et toutes les expériences qui ont pu être entreprises préalablement *in vitro* ont déjà été faites (remplacement). Pour assurer le bien-être des animaux utilisés dans ce projet (raffinement), les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans un environnement adapté à leur espèce et enrichi. De plus, l'important recul du laboratoire sur les modèles animaux de tumeurs cérébrales permettra de surveiller attentivement d'éventuels signes de souffrance et de prodiguer tous les soins pour lutter efficacement contre, les animaux recevront des antalgiques aussi souvent que nécessaire et les procédures les plus contraignantes seront conduites sous anesthésie générale.

11235 La présente étude est importante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des troubles affectant le système nerveux central (SNC) dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Nous utilisons une souris modèle de cette maladie, qui mime une mutation très fréquente chez les patients, à l'origine de déficits cognitifs et de troubles de la vision. Nous souhaitons tester l'efficacité d'approches de thérapie génique visant à supprimer la mutation afin de rétablir en partie l'expression de ces dystrophines. Plusieurs outils moléculaires ont été mis au point et nous devons comparer leur efficacité et déterminer un mode d'administration optimal. Dans ce projet, nous utiliserons des mesures non invasives (lentilles de contact), rapides et indolores des réponses des cellules de la rétine à l'aide d'électrorétinogrammes (ERG), une méthode facilement transposable aux patients et qui permettra de rapidement évaluer si un traitement injecté en périphérie (intraveineux, IV) a des effets bénéfiques sur le déficit d'ERG, ce qui prouvera qu'il est capable de passer les barrières protectrices du SNC, et nous comparerons les effets à ceux induits lors d'une injection intra-oculaire. Les ERG seront effectués avant et après traitement sur des souris mutantes mâles et leurs frères sains, avec respect de la règle des 3R : Remplacement : Les études précliniques pour cette maladie touchant uniquement les mâles se fait systématiquement sur des souris modèles. Réduction : Une première analyse statistique sera effectuée sur des groupes de n=8 souris et ne sera augmenté de 2-4 souris par groupe qu'en cas

de nécessité. L'étude complète portera sur un nombre minimal de 128 souris, maximal de 192 souris, incluant des groupes contrôles. La production permettant d'obtenir ces groupes nécessitera un total maximum de 464 souris (incluant les souris testées, celles gardées pour accouplement et femelles surnuméraires). Raffinement : L'ERG sera effectué sous anesthésie générale chimique sur une plateforme chauffée pour maintenir la température corporelle, sous analgésique pour leur éviter toute gêne induite par les lentilles sur la cornée, et des injections locale (collyre) et générale (solution saline) éviteront la déshydratation oculaire. Les injections IV et intra-oculaire (intra-vitréennes) seront effectuées sous anesthésie gazeuse. Lors des injections intraoculaires, nous effectuerons une administration locale (collyre) d'analgique. Les animaux resteront sous surveillance pendant la période post-opératoire et tout signe de souffrance/inconfort (quantifié à l'aide d'une grille d'évaluation) conduira à une intervention corrective en accord avec notre vétérinaire référent. Les conditions d'hébergement des animaux sont standards, avec un cycle normal de lumière / obscurité de 12 heures et de l'eau et de la nourriture disponible *ad libitum*.

11236 Contexte :

L'objectif du projet est d'élever des reproducteurs des poulets de chair et de les vacciner avec un vaccin inactivé contre la grippe H9N2 faiblement pathogène. Ces reproducteurs seront par la suite utilisés afin de produire des poussins avec différents statuts immunitaires, qui seront utilisés dans des études de développement de nouveaux vaccins contre la grippe faiblement pathogène H9N2 (les études sur poussins feront l'objet d'une demande d'autorisation de projet séparé)

Avantages et dommages :

Les dommages induits par les procédures peuvent être de l'inconfort, du stress et une gêne liée aux administrations du vaccin et aux prélèvements sanguins répétés.

Informations sur les espèces utilisées :

Les études de ce projet seront réalisées sur l'espèce cible (*Gallus gallus*) au plus proche des conditions réelles d'élevage. Au total un maximum de 75 reproducteurs seront élevés, vaccinés et utilisés pendant les 2 à 3 années du projet.

Mise en œuvre des 3Rs

Remplacement : Seules les études *in vivo* permettent de confirmer l'activité du vaccin en développement et c'est important de tester le vaccin dans des conditions qui se rapprochent des conditions réelles d'utilisation.

Réduction : L'effectif de reproducteurs élevés et vaccinés, utilisés dans ce projet (75 animaux au total) est réduit au minimum et permettra de garantir ensuite la production des poussins de seconde génération avec différents statuts immunitaires sur une période de 1 an.

Raffinement : L'hébergement sera réalisé en fonction des règles en vigueur sur la stabulation des volailles en expérimentation (multiples points d'accès d'eau et d'aliment, température adaptée en fonction de l'âge des animaux). Aucune douleur n'est attendue, toutefois un suivi adapté est mis en place afin de prendre en charge les animaux le plus rapidement et efficacement possible lors d'éventuelles réactions secondaires liées à l'injection du vaccin ou liées à des maladies naturelles. Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour garantir leur confort et leur bien-être.

11237 En élevage, les ruminants subissent des variations importantes de leur composition corporelle au cours de leur vie productive, ainsi qu'en réponse aux contraintes de leur environnement (variations du niveau alimentaire...). Etudier de manière fine la composition corporelle du ruminant permet d'explorer la capacité adaptative des animaux à diverses conditions d'élevage. L'objectif de ce projet est de mettre au point et de calibrer différentes méthodes d'estimation *in vivo* de la composition corporelle chez le ruminant. L'originalité de l'approche consiste à rechercher le meilleur compromis entre coût et précision, tout en limitant le caractère invasif et stressant des mesures chez l'animal vivant. Ceci est rendu possible grâce au recours aux techniques les plus modernes d'imagerie (échographie, scanner et imagerie 3D) et de chimie analytique.

L'élaboration de ce projet tient compte du principe des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Actuellement, il n'existe pas de modèle *in vitro* et/ou *in silico* pouvant remplacer le modèle animal. L'objectif de ce projet est de valider des méthodes alternatives en remplacement des modèles animaux (objectif Remplacer). La calibration se fera sur un nombre restreint de chèvres de réforme (n=20), et permettra d'obtenir des équations prédictives de la composition corporelle fiables et adaptées à la large gamme d'état corporel rencontrée couramment en élevage. Ce nombre d'animaux est le minimum nécessaire à l'obtention de données représentatives (objectif Réduire). Parmi les méthodes utilisées nous avons choisi celles qui sont les plus précises et les moins invasives, de façon à limiter le nombre de mesures par animal (objectif Raffiner).

11238 La cryptosporidiose est une maladie parasitaire intestinale à prévalence cosmopolite et responsable de diarrhées chez les individus immunodéprimés et les jeunes. Zoonose mal contrôlée, elle affecte la santé humaine et animale. Sa transmission est assurée de manière oro-fécale, suite à la contamination de denrées alimentaires ou eaux de boisson par les fèces d'un individu contaminé. Chez les animaux de production, elle conduit à des pertes économiques importantes ainsi qu'à des problèmes sanitaires et environnementaux. Les cibles les plus sensibles sont les jeunes ruminants (veaux, agneaux, chevreaux) en raison de l'immaturation de leur système immunitaire intestinal. Cette pathologie atteint également à la notion de bien-être animal, provoquant symptômes digestifs, déshydratation et retard de développement.

Seule une molécule possède une AMM (Halocur™) pour les veaux, mais celle-ci, pour être efficace, doit être administrée préventivement tous les jours pendant 7 jours à tous les animaux. Ceci représente une contrainte élevée et un coût pour l'éleveur.

En raison des limites de tolérance des vaccins chez les animaux de rente et de l'augmentation des résistances aux antiparasitaires qui rendent inefficace leur utilisation, des méthodes alternatives naturelles sont développées en santé vétérinaire.

La présente demande s'inscrit dans un projet qui vise à mettre en place une stratégie d'immunostimulation des jeunes animaux pour renforcer leurs défenses naturelles via l'administration par voie orale de produits levuriens à la naissance, afin de favoriser le contrôle de la cryptosporidiose des ruminants. Elle a pour objectif précis d'étudier la prise en charge et les capacités immunostimulantes des produits levuriens au niveau de l'intestin chez l'agneau, modèle de ruminant nouveau-né pour l'étude de la cryptosporidiose. Pour ce faire, la technique de chirurgie de création d'anses intestinales sur agneau sera mise en place. Elle permettra d'injecter *in situ* directement dans les anses intestinales les produits levuriens. Le second objectif de ce projet est d'évaluer l'impact du microbiote de l'agneau tout juste naissant dans la capacité immunostimulatrice des produits levuriens. Le but étant de déterminer si l'administration orale sur le terrain des produits levuriens doit être réalisée dès les premières heures de vie. Etant donné la contamination du nouveau-né par la flore vaginale maternelle et environnementale lors d'une naissance par voie basse, la naissance par césarienne constitue un second élément clé dans la réalisation de ce projet.

Ce projet s'inscrit dans la dynamique de respect de la règle des 3 R en expérimentation animale. La technique de chirurgie de création d'anses intestinales nous permet de réduire considérablement le nombre d'animaux à utiliser étant donné la possibilité de tester plusieurs produits sur un seul animal, ce qui serait impossible avec une administration par voie orale. Les traitements anesthésiques et antalgiques sont adaptés à la chirurgie intestinale et aux animaux nouveau-nés. L'animal ayant subi la chirurgie sera systématiquement maintenu avec un animal du même âge « accompagnateur » tout au long de l'expérimentation (Raffinement). Nous ne pouvons remplacer ce modèle *in vivo* étant donné la complexité de la mise en place des réponses immunitaires et des interactions cellulaires.

Le nombre d'animaux est estimé à 48 pour les 4 ans pour obtenir des résultats scientifiquement acceptables. (par an : 4 agneaux subiront la chirurgie (issus de césarienne ou non) + 4 animaux « accompagnateurs » + 4 mères, soit 12 animaux par an).

11239 L'insuffisance hépatique aiguë (IHA) se traduit par une attaque brusque et massive du foie chez les patients. Il s'agit de situations d'urgence qui peuvent nécessiter une transplantation dans les plus brefs délais. L'IHA a dernièrement été médiatisée en décembre 2017 suite à un décès lié à une intoxication involontaire au paracétamol qui est la première cause d'IHA dans les pays industrialisés. Mais l'IHA peut aussi être la conséquence d'hépatites virales, cause prédominante dans les pays en voie de développement, ou encore d'intoxication aux champignons ou aux produits toxiques. Le paracétamol est un composé chimique utilisé comme antalgique (anti-douleur) et antipyrétique (anti-fièvre), qui figure parmi les médicaments les plus utilisés et prescrits au monde. En France, il est le médicament le plus prescrit (+ de 260 millions de doses) car il y a très peu d'alternative à l'usage du paracétamol pour le traitement de la douleur. En cas de surdose, le paracétamol provoque une sévère toxicité pour le foie par la production d'un métabolite hépatotoxique pouvant entraîner une nécrose hépatique, comme cela a été aussi démontré chez la souris. Les mécanismes de nécrose programmée par nécroptose ou par ferroptose ont été mis en évidence dans les dommages hépatiques induits par le paracétamol. Par ailleurs, l'infection par le virus murin MHV3 provoque aussi une insuffisance hépatique aiguë caractérisée par une nécrose hépatique chez la souris.

Nous avons identifié au moyen de tests *in vitro* plusieurs molécules inhibitrices de la nécrose programmée pour lesquels un brevet a été déposé. Ces molécules pourraient constituer de nouveaux médicaments pour soigner l'IHA sachant qu'aucun traitement efficace n'est actuellement disponible chez l'homme. Afin de progresser sur la connaissance du potentiel thérapeutique de ces molécules, notre projet est d'évaluer l'effet d'inhibiteurs de nécrose programmée (inhibiteurs de la kinase RIPK1 ou de ferroptose) sur l'IHA chez la souris.

Pour cela, nous utiliserons 2 modèles d'hépatites expérimentales, (1) une exposition aiguë au paracétamol, (2) l'infection par le virus murin de l'hépatite. Toutes les souris seront traitées par l'agent inducteur d'une hépatite aiguë, puis traitées par les inhibiteurs de nécrose programmée (inhibiteur de RIPK1 ou de ferroptose). Des analyses quantitatives de l'atteinte hépatique seront réalisées ainsi que l'étude de marqueurs de nécrose et des cytokines pro-inflammatoires afin de caractériser une possible protection apportée par les inhibiteurs.

Ce protocole est construit en suivant la règle des 3 R, en effet :

- Le processus de l'hépatite et l'inflammation en particulier se déroulant dans l'organe en impliquant le recrutement de cellules venant d'autres parties de l'organisme, on ne peut pas envisager le remplacement par des tests *in vitro*.

- le nombre de souris engagés dans ces expériences (688) a été réduit au minimum pour permettre une validation des résultats statistiques.

- L'étude a été raffinée au mieux en privilégiant un traitement de courte durée permettant à la fois la mesure des paramètres d'évaluation de l'hépatite et limitant le développement de douleurs et malaise induits par le traitement. Enfin nous avons anticipé l'étude de tous les organes pertinents (4) qui permettront une étude complète de la pathologie et des molécules pour un maximum d'informations.

Cette partie expérimentale est indispensable pour caractériser l'effet des inhibiteurs de nécrose programmée et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques de l'IHA.

11240 La transformation maligne est associée à des dérèglements du métabolisme cellulaire. La mitochondrie est au centre de la régulation du métabolisme cellulaire énergétique, et une altération des fonctions mitochondriales joue un rôle dans le développement tumoral. Ainsi, interférer dans la fonction de la mitochondrie représente de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les traitements anti-cancéreux. L'objectif est de comprendre les mécanismes moléculaires qui contrôlent la prolifération physiologique et tumorale de l'intestin.

Cette étude est réalisée sur 4 modèles de souris transgéniques porteuses de mutations constitutives ou inductibles par traitement médicamenteux afin de tester leurs implications dans le développement tumoral intestinal et dans la physiologie intestinale. L'usage exclusif de lignées cellulaires ne permettrait pas d'appréhender le tissu intestinal dans son ensemble. L'intestin est un

organe complexe qui se renouvelle constamment, est composé de plusieurs types cellulaires et dont le métabolisme et le système immunitaire influencent énormément la tumorigenèse.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum permettant une analyse statistique efficace des résultats d'après nos données antérieures. Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera l'étude de 790 souris. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse des animaux, une surveillance trois fois par semaine des animaux sera réalisée en respectant des points limites bien définis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. L'utilisation de régime antioxydant dans les conditions de tumeurs du colon permettra de montrer les bienfaits de la réduction du stress oxydant sur la progression tumorale. Les greffes de moelle osseuse et les échographies rectales seront réalisées sous anesthésie générale gazeuse pour éviter toute douleur aux animaux.

A terme ce projet permettra de mieux caractériser le développement de cancers de l'intestin liés à des dérèglements métaboliques et de stress oxydant. Nous espérons identifier des acteurs moléculaires et des voies de signalisation capables de freiner ou stopper le développement du cancer colorectal (CRC).

11241 Réduire la mortalité des veaux est un enjeu majeur pour les éleveurs. Les maladies diarrhéiques et respiratoires, constituent une cause majeure de morbidité et représentent de 30 à 90% de la mortalité constatée. Le projet souhaite par une approche novatrice identifier des biomarqueurs chez les jeunes veaux permettant de prédire précocement leur susceptibilité aux maladies diarrhéiques et respiratoires afin de pouvoir apporter des soins particuliers aux animaux les plus fragiles. Les jeunes animaux dépendent fortement de leur immunité innée pour se défendre contre les infections avant d'être capable de développer leur propre immunité acquise. C'est ce potentiel immunitaire innée des veaux que nous souhaitons quantifier grâce à un test sanguin. La réponse immunitaire innée du veau sera quantifiée puis corrélée avec les paramètres génétiques des animaux et à leur statut sanitaire (présence de pathogènes entériques et respiratoires dans les premières semaines de vie). L'analyse des différents paramètres devrait nous permettre d'identifier un ou plusieurs biomarqueurs de sensibilité aux maladies du jeune.

Pour réaliser cette étude jusqu'en 2020 nous suivrons au total 500 veaux de race laitière (Holstein) et 500 veaux de race à viande (Charolais) pendant 2 mois, ainsi que la moitié environ de leurs mères (soit 500 vaches). Un tiers de ces animaux seront issus d'une ferme expérimentale et le restant seront issus de fermes commerciales. Les individus sélectionnés seront ensuite maintenus dans l'élevage sans autres interventions.

Le principe des 3R a été pris en compte dans la construction du projet :

- Remplacement : les mécanismes étudiés mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte qu'il est impossible de reproduire dans un modèle cellulaire, de culture d'organe ou dans une autre espèce.

- Réduction : le choix du nombre de veaux intégrés dans l'étude correspond au minimum nécessaire pour mener des analyses génétiques.

- Raffinement : les conditions d'hébergement, d'alimentation, de prophylaxie et de traitement des animaux ne sont pas modifiées par la mise en œuvre du projet. Les divers prélèvements seront assurés par du personnel expérimenté, avec des moyens de contention et du matériel adaptés. Des points limites sont définies et régulièrement contrôlés.

11242 Les dispositifs médicaux doivent faire l'objet d'un ensemble de tests réglementaires de toxicité afin d'évaluer leur biocompatibilité selon la stratégie de tests définie dans la norme ISO 10993-1. Ce projet décrit ici et défini dans les normes ISO 10993-6 et ISO 10993-11 a pour objectif la protection des êtres humains contre les risques biologiques potentiels de l'utilisation de dispositifs médicaux (DM) et en particulier les risques concernant les effets locaux après implantation selon l'ISO 10993-6 et la toxicité systémique avec exposition répétée (toxicité systémique subaiguë, subchronique et chronique selon la durée d'exposition) selon l'ISO 10993-11.

Ces deux risques peuvent être évalués séparément et font l'objet de 2 normes distinctes. Cependant, dans un but éthique et afin de réduire au maximum l'utilisation d'animaux, on s'attachera à coupler ces études, lorsque cela est possible, afin d'utiliser les mêmes animaux pour évaluer à la fois les effets locaux et les effets systémiques.

Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet est de 65 (jeunes adultes, tel que défini dans la norme). Ils disposent d'un enrichissement de leur environnement (tunnels en carton pour les rats ou briques en bois et plateforme pour les lapins).

Ce projet est constitué des études suivantes :

- Evaluation des effets locaux après implantation : Cette étude est réalisée chez le rat ou le lapin (en général, un total de 5 rats ou 3 lapins est suffisant pour pouvoir analyser en histologie 10 sites d'implantation par dispositif ou par matériaux. Si l'étude est couplée avec l'évaluation de la toxicité systémique il faut alors ajouter un groupe contrôle séparé, soit un total minimum de 10 rats ou 6 lapins).

Ce test consiste à implanter chez l'animal le dispositif médical ou un échantillon représentatif de ce dernier. La durée de la période d'observation qui suit dépend de l'indication clinique du dispositif, de sa durée d'exposition chez le patient et de son éventuel temps de dégradation (en général 2 semaines à 1 an). Pendant toute la période d'observation, les animaux seront régulièrement pesés, les sites d'implantation observés pour l'éventuelle apparition de réactions d'intolérance (par exemple présence d'érythèmes ou d'oedèmes). Des observations cliniques sur l'état général des animaux seront également conduites. A la fin de la période d'implantation, les animaux sont euthanasiés et les sites d'implantation sont prélevés puis conservés dans un fixateur pour analyses histologiques. Selon le dispositif à évaluer, il peut être également nécessaire d'effectuer les analyses histologiques des ganglions axillaires.

Remarque : pour s'adapter à la destination finale du dispositif, le site d'implantation peut varier : sous-cutanée ou intra-utérin ou intra-péritonéal (en contact avec le muscle du péritoine) le plus souvent chez le rat et intra-synovial ou intra-oculaire le plus souvent chez le lapin.

- Evaluation de la toxicité systémique après implantation avec exposition répétée (toxicité systémique subaiguë, subchronique et chronique) : Cette étude est réalisée chez le rat ou le lapin (le nombre d'animaux dépend de la durée d'exposition à évaluer et de la nécessité ou non d'étudier les 2 sexes. Le minimum requis est de 10 rats ou 6 lapins pour une étude de toxicité subaiguë sur un seul sexe et le maximum est de 60 rats ou 32 lapins pour une étude de toxicité chronique sur les 2 sexes).

Ce test consiste à implanter chez le rat ou le lapin, au niveau du site de traitement pouvant être adapté à l'utilisation chez l'Homme, le dispositif médical ou un échantillon représentatif de ce dernier. Le principe est le même que pour l'évaluation des effets locaux décrite précédemment mais l'évaluation de la toxicité systémique est ajoutée. Il peut donc être également nécessaire pour certaines études de mesurer la consommation alimentaire et hydrique des animaux au cours de toute la phase expérimentale. Une analyse des urines peut également être nécessaire en fin de phase expérimentale. A la fin de la période d'implantation, un prélèvement final de sang est effectué afin de procéder aux analyses biochimiques, hématologiques et enzymologiques. Les animaux sont euthanasiés et les sites d'implantation sont prélevés puis conservés dans un fixateur pour analyses histologiques. Une autopsie complète de l'animal est également réalisée et les principaux organes sont prélevés puis conservés dans un fixateur pour analyses histologiques.

Les points limites suivants ont été définis et conduisent à une décision d'euthanasier l'animal pour éviter toutes souffrances inutiles :

- Signes observés seuls amenant à une euthanasie de l'animal : convulsions (continues pendant 15 minutes chez le rat et sans durée minimale chez le lapin), vocalisations continues pendant plus d'une minute en l'absence de contention, perte de poids $\geq 20\%$ sur 72 heures, hémorragie importante, existence d'une plaie ouverte au niveau du site d'implantation qui ne se refermerait pas malgré les soins apportés.

- Signes en association pouvant amener à une décision d'euthanasier l'animal : cyanose, gasping, piloerection + prostration, animal conscient (réagissant à la stimulation) mais incapable de bouger,

animal ne buvant plus et/ou ne mangeant plus, pertes d'équilibre persistantes, détresse respiratoire sévère ou persistante. Le Directeur d'études devra déterminer au cas par cas sur l'association de ces signes, leur intensité et leur persistance dans le temps s'il peut conclure à une mort certaine de l'animal et demander son euthanasie en considérant cette mortalité comme étant attribuable à l'élément d'essai administré.

Par ailleurs, ces études peuvent s'étaler sur une longue période (jusqu'à 1 an). De ce fait, certains animaux peuvent développer spontanément des pathologies non liées à l'implantation de l'élément d'essai (par exemple, apparition de tumeurs en particulier chez le rat). Dans ce cas, les possibilités de soins à apporter aux animaux sont assez réduites. Ces animaux devront être suivis régulièrement afin de limiter au maximum leurs souffrances et décider ou non de leur euthanasie.

11243 Les volailles sont régulièrement utilisées dans la recherche préclinique dans le domaine de la santé animale (espèce cible). Ces animaux sont notamment inclus dans des études de tolérance (locale ou générale) qui ont pour but de mettre en évidence des réactions locales au site d'application (tolérance locale) ou l'éventuelle toxicité du médicament vétérinaire dans les conditions normales d'emploi chez l'animal (tolérance générale sur espèce cible).

Dans ce type d'étude, un suivi du produit dans l'organisme entier (détection dans le sang/plasma, détection dans les tissus) ou/et un suivi des modifications hématologique, biochimique et ou enzymatique est également possible.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement d'évaluer la tolérance de l'organisme suite à administration d'un produit, il est indispensable de recourir à l'animal entier.

Ce projet se déroulera sur plusieurs études et selon plusieurs procédures expérimentales : la procédure d'administration du produit à tester, la procédure de prélèvements sanguins répétés. De plus, des prélèvements de différents tissus ou organes seront parfois nécessaire.

Les prélèvements de sang seront toujours réduits au minimum et toujours conformes aux bonnes pratiques vétérinaires.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés par groupe.

Une attention particulière est portée à l'enrichissement du milieu pour que les animaux puissent exprimer leur comportement normal (perchoir, sciure.).

Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets secondaires pour une prise en charge rapide (observation de l'état de santé général, consommation alimentaire et hydrique.).

Le but du projet est de tester 5 produits différents ; ces études sont généralement menées sur des groupes de 10 animaux, 5 groupes (1 groupe par dose administrée) soit un total de 250 animaux sur 5 ans.

11244 Chez l'homme, les infections par des microorganismes pathogènes tels que les virus (comme les adénovirus) et les parasites (comme le trypanosome) provoquent chaque année de nombreuses pathologies à travers le monde conduisant dans certains cas au décès du malade. Chez les Adénovirus et le Trypanosome, il est donc nécessaire d'identifier les facteurs moléculaires impliqués et de comprendre leurs rôles dans ces infections. Récemment, 30 facteurs potentiels ont été identifiées pour les deux pathogènes.

La génération d'anticorps monoclonaux, chez la souris, contre ces facteurs candidats représente un moyen unique et spécifique de pouvoir comprendre leurs mécanismes d'action et leur rôles précis dans l'infections. Il est indispensable de passer par une étape d'immunisation de souris. Une fois ces mécanismes décryptés, la recherche de molécules bloquant ces mécanismes pourra être testées, ouvrant la voie à de nouvelles thérapeutiques pour ces deux infections, virale et parasitaire. Il n'est pas possible de remplacer l'étape d'immunisation de souris car il est nécessaire de générer des anticorps chez l'animal de plus les autres techniques *in vitro* ne génèrent pas suffisamment de diversité. Cependant cette procédure est équivalente à une vaccination et elle ne dure que 15 jours. Le protocole d'immunisation utilisé permet de réduire le nombre de souris à 2 au lieu des 5 dans le

protocole classique et de raccourcir (le temps 15 jours au lieu de 3 mois). Enfin les animaux sont hébergés dans des conditions conformes à la réglementation (en groupe de 2 à 5 animaux) et surveillés quotidiennement. L'expérience (littérature) a montré que cette immunisation ne conduit jamais à une détérioration de l'état général des animaux et n'a jamais nécessité la mise en œuvre de médication générale dans le but de réduire douleur, souffrance ou angoisse. Cependant si un animal présente tout signe de douleur, un traitement antalgique sera réalisé. La douleur initiale pouvant impacter la mobilité de l'animal il est envisagé si besoin de réhydrater l'animal par injection de sérum physiologique (0,5ml) par voie sous cutanée et de faciliter l'accès à l'aliment en la plaçant au sol dans la cage.

Au final sur une période de 5 ans, 60 souris seront utilisées

11245 Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et le plus meurtrier chez la femme, à l'origine d'un peu plus de 11 800 décès par an en France. C'est une maladie complexe, il existe de nombreux sous types de tumeurs mammaires qui ont des profils histologiques, génétiques et génomiques variés expliquant une évolution clinique différente. Cette hétérogénéité constitue à l'heure actuelle un des freins majeurs à une prise en charge thérapeutique optimale des patientes. Le développement de modèles précliniques mimant la complexité de la maladie est donc indispensable pour définir au mieux le traitement de demain. De plus, 20 % des cancers du sein vont générer des récurrences qui peuvent évoluer en maladie métastatique, un stade de la maladie actuellement incurable. Les principales cellules responsables de ces rechutes sont les cellules souches cancéreuses (CSC) qui ne sont pas affectées par les traitements conventionnels (chimiothérapie, radiothérapie).

Le but de cette étude est de tester des thérapies anti-CSC, en combinaison avec les traitements conventionnels pour réduire efficacement le risque de rechute et le développement de métastases. Les traitements utilisés, ont déjà montré leur efficacité, *in vitro*, maintenant l'objectif est de tester l'activité de ces composés sur la population de CSC *in vivo* et d'apporter une preuve de concept de leur intérêt en couplage avec les traitements anti-tumoraux classiques dans les cancers du sein. Ces essais précliniques seront réalisés sur des modèles de xénogreffes de tumeur primaires (Patient-Derived Xenograft, PDX). Dans un précédent projet, nous avons développé une banque de PDXs issues de tumeurs de patientes atteintes de cancer du sein.

Nous utiliserons la méthode des 3 R pour réduire à son minimum le nombre d'animaux utilisés. Nos études seront réalisées de manière séquentielle pour déterminer l'action des drogues sur le développement tumoral. Si nécessaire, des études pilotes seront menées sur un petit nombre d'animaux (maximum 15) afin de s'assurer de leur bonne tolérance à ces molécules et d'adapter les doses à administrer à notre souche de souris. Pour chacun des composés, nous nous limiterons au nombre minimum d'animaux permettant de caractériser leur efficacité sur au moins 2 modèles différents de xénogreffes mammaires. Pour mener ces tests d'efficacité, au maximum 4 groupes de 6 animaux seront utilisés, incluant un groupe contrôle qui recevra le véhicule de solubilisation du composé et un groupe contrôle positif recevant le traitement de référence en clinique de la tumeur greffée. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux et lorsque possible, ces groupes contrôles seront communs à plusieurs tests d'efficacité. De même, le suivi du développement tumoral se fera par des mesures cinétiques utilisant des procédés non invasifs : la mesure du volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse ou l'imagerie par bioluminescence. Les procédures de transplantation et d'imagerie seront réalisées sous anesthésie. Enfin, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton) et par leur maintien en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement.

Les études utilisant ce type de traitement, seront réalisées sur des cohortes de 24 animaux avec une répétition de 3 études par an sur différentes xénogreffes, le nombre d'animaux nécessaire est donc de 2 430 souris au total.

11246 Les pathologies broncho-pulmonaires, cancer pulmonaire et bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), sont des maladies respiratoires graves en passe de devenir très

prochainement les principales causes de mortalité mondiale. Le principal facteur de risque est le tabagisme mais il a été montré récemment qu'une mutation particulière, présente sur certains récepteurs à la nicotine, est fortement associée à l'incidence de ces pathologies pulmonaires. Le but de notre projet est ici d'étudier, chez les souris portant cette mutation, les remaniements histologiques au niveau pulmonaire et leur conséquence sur la fonction pulmonaire.

Notre projet, visant à étudier les remaniements tissulaires pulmonaires associés à cette mutation, est conditionné par l'utilisation de souris transgéniques exprimant la mutation d'intérêt. Ce projet ne peut être réalisé sur des cultures de cellules pulmonaires. En particulier, l'étude des remaniements histologiques pulmonaires, de la réaction inflammatoire et de la fonction respiratoire ne peut être réalisée qu'*in vivo* (Remplacement).

Nous avons restreint au minimum le nombre d'animaux utilisés. La plupart des protocoles expérimentaux envisagés sont maîtrisés par le laboratoire depuis plusieurs années. Nous en connaissons donc la variabilité expérimentale, et le nombre d'animaux à inclure dans chaque protocole est réduit au minimum. Les tests d'analyse statistique non paramétriques, adaptés aux échantillons faibles, sont systématiquement utilisés (Réduction). Ce projet sur 5 ans nécessite l'utilisation de 402 souris C57BL/6J issues des mêmes portées, dont 134 souris non mutées, 134 souris homozygotes pour la mutation $\alpha 5D398N$ et 134 souris hétérozygotes pour la mutation $\alpha 5D398N$.

Les protocoles ont été systématiquement discutés avec un vétérinaire ; des anesthésiques et analgésiques seront utilisés lorsque nécessaires et les animaux seront surveillés au moins une fois par jour pour observer tout comportement anormal témoin d'une souffrance. Les animaux seront euthanasiés dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement). Une attention particulière est portée à l'enrichissement du milieu : sélection de litières propices à l'aménagement, utilisation en simultané ou en alternance de solutions d'enrichissement du milieu, eau et nourriture à volonté (Raffinement).

11247 Pour améliorer la santé des jeunes bovins, il est important d'évaluer leur capacité de réponse immunitaire innée car c'est la première ligne de défense chez les jeunes animaux, après la disparition des anticorps d'origine maternelle et avant la mise en place des réponses adaptatives aux infections ou aux vaccins.

Les capacités de défenses immunitaires innées à la naissance vont impacter sur la santé du jeune animal et en retour, ces capacités vont évoluer dans le temps sous l'effet des infections rencontrées au jeune âge. Nous cherchons à comprendre si ce potentiel immunitaire inné est contrôlé génétiquement, s'il est associé à une plus grande fragilité ou résistance aux maladies infectieuses du jeune et s'il favorise une meilleure réponse vaccinale. Ces données nous permettront de trouver des marqueurs prédictifs de la fragilité ou de la robustesse des veaux en élevage et de proposer des conduites d'élevage adaptées pour les individus qui seront identifiés comme plus fragiles vis à vis des maladies infectieuses (diarrhées, troubles respiratoires).

Pour réaliser cette étude, nous suivrons une trentaine de veaux femelles de la race laitière holstein de la naissance à l'âge de 1 an au sein d'un élevage expérimental. Des prises de sang seront réalisées de la naissance à l'âge de 1 an (7 jours, 1 mois, 6 mois et 1 an) afin de tester la réponse immunitaire innée, ainsi que d'autres paramètres.

La question scientifique posée est l'évolution avec l'âge de la réponse immunitaire innée (mesurée dans le sang) chez les jeunes veaux en bonne santé et son caractère prédictif pour la réponse vaccinale (vaccination avec le rispoval contre le VRS bovin, selon la procédure appliquée dans l'élevage). Il n'existe pas de modèle de remplacement de l'animal pour aborder cette question. Cependant l'animal est suivi au sein de son troupeau sans modification de ses conditions d'élevage (et donc de vaccination) et l'animal restera dans son troupeau à l'issue de l'expérience. La possibilité de suivre les mêmes individus de leur naissance à l'âge de 1 an au sein d'un même élevage répond à la règle des 3 R, à savoir réduction du nombre d'animaux dans le protocole expérimental. De plus, ces individus seront maintenus au sein de l'élevage sans contraintes particulières en dehors des

prises de sang, qui seront adaptées à leur poids en fonction de leur âge, ce qui répond à leur bien-être (raffinement).

11248 Le staphylocoque doré est l'une des bactéries la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine, responsable d'infections de gravité variable, allant d'infections de la peau, à des septicémies sévères. Les nombreuses tentatives de vaccination contre cette bactérie se sont jusqu'à présent soldées par des échecs. Elles avaient principalement pour objectif la stimulation de la fabrication d'anticorps contre une ou quelques parties du staphylocoque (antigènes). La réponse immunitaire provoquée était partielle, et peu efficace pour lutter contre la bactérie.

Des études récentes ont montré que l'immunité contre le staphylocoque doré est complexe et ne fait pas intervenir seulement les anticorps mais l'ensemble du système immunitaire. Par conséquent, pour être efficace, un vaccin contre cette bactérie doit provoquer une réponse immunitaire globale. Ceci explique pourquoi les précédentes tentatives de vaccination, reposant sur une réponse seulement partielle de l'immunité, ont échouées.

Il a aussi été récemment découvert un nouveau type de matériel génétique chez les bactéries, appelé les ARN régulateurs. Certains de ces ARN, comme l'ARN régulateur SprD sont présents chez tous les staphylocoques dorés. Une souche de staphylocoque doré pour laquelle le gène SprD a été supprimé (Δ SprD) a été fabriquée. Cette souche ne provoque pas d'infection lorsqu'elle est administrée en intraveineux aux souris à la différence d'un staphylocoque doré classique. Cela prouve le caractère essentiel de ce gène pour la survenue de l'infection.

Les ARN régulateurs, notamment la souche Δ SprD, n'ont jamais été testés comme moyen vaccinal. Notre projet est donc de proposer une nouvelle voie de vaccination contre le staphylocoque doré en utilisant la souche Δ SprD.

Notre hypothèse est que l'exposition à une souche de staphylocoque doré entière et vivante mais "atténuée" par la suppression du gène SprD pourrait permettre à la souris de développer une immunité protectrice contre cette bactérie. L'originalité de cette démarche est que nous utiliserons une bactérie entière et vivante pour provoquer une réaction immunitaire globale, et non pas quelques parties comme dans les études précédentes.

Notre étude comportera plusieurs phases. La première sera une étape de "vaccination" ou nous administrerons aux souris sous la peau le staphylocoque doré Δ SprD. Cela aura pour objectif de créer une réponse immunitaire protectrice. Puis, après 1 mois, il s'agira d'une phase d' "infection", les souris seront alors soumises à une injection intraveineuse de staphylocoque doré classique, causant normalement une infection. L'objectif est de montrer que les souris préalablement "vaccinées" seront protégées de l'infection à un staphylocoque doré classique par rapport à des souris non vaccinées. Par ailleurs, le deuxième objectif est de vérifier dans une prise de sang quelles cellules de l'immunité sont activées par l'injection du vaccin.

En cas d'absence de protection après une seule injection de vaccin, nous avons prévu une phase supplémentaire où les souris recevront 2 doses vaccinales à un mois d'écart avant d'être soumises à la phase d' "infection".

Afin d'obtenir des résultats significatifs, nous avons estimé qu'il faudra au maximum 320 souris au total selon le déroulement et les résultats des différentes phases. Les expérimentations seront réalisées selon la règle des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement). L'évaluation de l'efficacité d'une vaccination nécessite l'utilisation d'un modèle animal, et le modèle choisi, la souris Swiss comporte un système immunitaire comparable au système immunitaire humain. Les animaux seront hébergés dans des cages de taille adaptée pour des lots de 5 souris. Un enrichissement de l'environnement sera également mis en place. La litière sera changée régulièrement, et les souris auront un accès libre à l'eau et à la nourriture (spécifique pour rongeurs). Elles seront hébergées au laboratoire au minimum une semaine avant le début des expérimentations afin de s'habituer à l'environnement. Les expérimentations seront effectuées dans une salle différente du lieu d'hébergement, sous anesthésie générale pour les gestes qui le nécessitent. Le personnel de l'animalerie est formé à la contention des animaux. L'état général des souris sera évalué quotidiennement avec analyse des signes suivant : apparence, expression faciale, et réactivité, et

une euthanasie est prévue en cas de signes patents de souffrance. En cas de l'obtention rapide de résultats significatifs, une réduction du nombre de souris est prévue au protocole.

En raison de l'impasse actuelle des tentatives de vaccination, ce premier essai utilisant les ARN régulateurs permettra d'ouvrir la voie au développement de nouveaux vaccins contre le staphylocoque doré chez l'homme.

11249 Des études récentes montrent que la cicatrisation complète de la muqueuse intestinale réduit les taux de rechute et d'hospitalisation ainsi que le recours à la chirurgie chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI). Comprendre les mécanismes impliqués dans la réparation de l'épithélium intestinal, en particulier le rôle des « centrales énergétiques » cellulaires (les mitochondries) dont l'architecture et le fonctionnement sont altérés en phase inflammatoire, pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le but de favoriser la régénération de la muqueuse intestinale.

Le projet de recherche proposé a pour but de caractériser l'impact de l'inflammation et des mécanismes impliqués dans la réparation consécutive au stress inflammatoire sur la fonction mitochondriale. Dans ce but, nous utiliserons un modèle d'inflammation intestinale chimio-induite chez la souris pour étudier temporellement la bioénergétique mitochondriale de cellules épithéliales intestinales isolées. Les résultats obtenus lors de cette étude préclinique seront comparés à ceux réalisés à partir de biopsies prélevées chez des patients MICI afin d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques.

Ces expériences seront menées dans le respect du bien-être animal dans un modèle animal que nous avons bien caractérisé, le modèle d'inflammation chimio-induite au dextran sulphate de sodium (DSS). Un deuxième inducteur chimique est envisagé si l'induction au DSS ne se révélait pas satisfaisante. Le nombre total de souris C57BL/6 utilisé sera de 180 : 90 (12 animaux développant une inflammation intestinale + 6 contrôles x 5 temps d'étude) x 2 inducteurs chimiques d'inflammation, est le minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables sur le plan statistique, prenant en compte la variabilité interindividuelle et le fait que nous testons un effet qui est probablement de faible intensité. Nous veillerons à réaliser le maximum de prélèvements sur chaque animal euthanasié afin de limiter le nombre total d'animaux à utiliser. Pour ce faire, parallèlement à l'étude de suivi quotidien (scores inflammatoires, poids corporel), nous combinerons différentes approches : fonctionnelle (tests de perméabilité), biochimique (mesure de paramètres inflammatoires et cicatriciels), histologique (évaluation de la ré-épithélisation, expression de protéines clés) et analyse de l'expression génique.

Les résultats de ce projet visent à évaluer le rôle de la mitochondrie dans la cicatrisation de la muqueuse intestinale après une poussée inflammatoire et d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques et/ou adjuvantes favorisant ce processus, sans induire d'effets délétères à l'origine de possibles complications. Les objectifs du projet ne peuvent donc être atteints sans recours à un animal modèle de l'Homme (modèle d'inflammation chimio-induite). Les procédures expérimentales ne peuvent donc pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Les procédures stressantes seront limitées au maximum.

Notre protocole répond aux impératifs des 3R.

Remplacement : Des études *in vitro* ont été menées pour étudier les mécanismes d'action avant d'envisager cette étude préclinique.

Réduire : Le nombre fixé d'animaux est de 180. Toutefois, si aucune différence n'est observée entre les animaux contrôles aux différents temps de la cinétique, ce nombre sera réduit (10 animaux au lieu de 30 contrôles, soit 70 animaux au total par série d'inducteur chimique). De plus, si le modèle DSS s'avère efficace pour induire une inflammation de même intensité que celle induite lors d'études précédentes dans un autre établissement utilisateur, le 2ème modèle d'inflammation ne sera pas utilisé, soit 90 animaux.

Raffinement : Les animaux seront élevés en cage collective dans des conditions favorables à leur bien-être, dans des cages de taille appropriée. L'environnement sera enrichi et l'alimentation sera

contrôlée. Les animaux seront surveillés quotidiennement avec évaluation de leur aspect physique et de leur comportement. Si les points limites fixés étaient atteints (fiche de score inflammatoire), les souris seraient euthanasiées. En effet, l'utilisation d'agents thérapeutiques anti-inflammatoires ou analgésiques n'est pas envisageable dans ce type d'approches fonctionnelles, visant à étudier l'inflammation.

11250 Nous travaillons sur l'activation des cellules souches musculaires chez les poissons. Ces cellules souches sont indispensables à la croissance musculaire des poissons. Nous avons mis au point un protocole d'extraction de ces cellules à partir de muscle de truites. Ces cellules sont en quantités plus importantes dans les jeunes stades (entre 2 et 25g). Dans le cadre d'un projet de thèse, nous avons pour objectif d'identifier les gènes impliqués dans l'activation continue des cellules souches chez la truite. Notre projet nécessite l'obtention de cellules souches non activées (quiescente) au moyen d'une mise à jeun de truite pour les comparer avec des cellules activées. Ces analyses nous permettront d'identifier les gènes spécifiquement impliqués dans l'activation continue des cellules souches chez la truite.

R1 : Le muscle de truite est la seule source de cellules souches musculaires et il n'existe aucune lignée de cellules musculaires chez les poissons capables de reproduire la myogénèse *in vitro*.

R2 : Nous limiterons le nombre de poissons à 50 pour l'expérience, ce qui nous permet d'obtenir suffisamment de cellules pour conduire nos analyses.

R3 : Des expériences passées, ont montré que le jeûne chez la truite n'entraînait aucune mortalité et une faible perte de poids. En effet, de par leur cycle biologique naturel, les salmonidés sont adaptés à subir des périodes de jeûne. Les manipulations sont réalisées le plus rapidement possible pour limiter le stress. Les prises de sang sur les femelles et l'extraction des œufs sont réalisées sous anesthésie générale.

11251 Une affection auto-immune (AAI) est causée par un dysfonctionnement du système immunitaire conduisant ce dernier à s'attaquer aux constituants normaux de l'organisme. Dans cette situation les anticorps, normalement capables de différencier les cellules normales de l'organisme des agents pathogènes (bactéries, virus...) et cellules anormales, se retournent contre l'organisme. Ils engendrent alors des lésions cellulaires ou tissulaires responsables de signes cliniques plus ou moins sévères. La libération de ces anticorps est une cause fréquente de lésions rénales pouvant se traduire dans certains cas par une insuffisance rénale progressive plus ou moins rapide et grave.

Le traitement de première ligne le plus efficace et utilisé chez le chien en cas d'AAI consiste en l'administration de corticoïdes. Ce traitement, bien qu'efficace, influence directement et indirectement le fonctionnement rénal, en pouvant occasionner des lésions et augmenter le débit de filtration glomérulaire (DFG : volume de liquide filtré par le rein par unité de temps). Un suivi fiable de la fonction rénale chez ces animaux atteints d'AAI sous corticoïdes est donc indispensable.

Actuellement, le dosage de la créatinine sanguine est l'outil le plus communément utilisé pour évaluer indirectement la fonction rénale. Néanmoins, ce marqueur est influencé par la masse musculaire. Or, l'administration prolongée de corticoïdes peut induire une fonte musculaire, l'utilisation de la créatinine comme marqueur de la fonction rénale est donc discutable dans cette situation. Récemment, l'utilisation d'un nouveau marqueur de fonction rénale, la diméthylarginine symétrique (SDMA), non influencée par la masse musculaire, a été décrite. Si son utilisation semble intéressante dans ce contexte, des données personnelles non publiées, à paraître dans des études en cours, ont montré des résultats surprenants quant à l'évolution de la concentration sérique en SDMA chez des chiens sains ayant reçu une dose unique de corticoïdes par voie intraveineuse.

Les objectifs du projet sont :

1-Décrire et comparer la fonction et la souffrance rénales évaluées par l'estimation du DFG, les mesures de créatinine, de SDMA, la détermination de marqueurs urinaires chez des chiens sains avant et après administration de doses immunosuppressives de corticoïdes.

2-Caractériser et quantifier l'évolution de la concentration sanguine en SDMA avant et après traitements, comparativement aux variations de DFG et de créatinine constatées.

3-Déterminer si la concentration sanguine en SDMA peut être utilisée comme marqueur fiable de la fonction rénale chez des chiens recevant des corticoïdes.

Pour réaliser ce projet, une étude sera conduite sur des chiens Beagles réutilisés d'autres projets et ne présentant pas d'affection auto-immune. Un total de 16 chiennes femelles adultes (>12 mois) sera inclus dans l'étude. Cette étude sur des chiens en bonne santé est indispensable avant de la transposer sur des animaux malades de propriétaires afin d'évaluer directement l'impact des corticoïdes sur la fonction rénale en s'affranchissant des effets d'une AAI concomitante.

Pour se faire, la fonction rénale sera évaluée avant et pendant administration de corticoïdes. Des dosages sanguins seront réalisés pour déterminer notamment le DFG pour chaque animal. Une analyse urinaire complète (sur miction spontanée en cage à métabolisme pendant une durée de maximum 24h) sera également réalisée.

Les chiennes seront aléatoirement séparées en deux groupes et le projet sera conçu sur un modèle de cross-over, ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux, chaque animal étant son propre contrôle. En effet, un groupe recevra le traitement corticoïde et l'autre groupe recevra un traitement placebo (gélule de gélatine contenant du lactose) pendant une semaine, les groupes étant interchangeables après une période sans traitement de 4 semaines. La fonction rénale sera évaluée avant et après chaque période de traitement au moyen des dosages de créatinine et de SDMA sanguine, d'une détermination du DFG et d'une analyse d'urine complète. Le risque de stress et de douleur lors de la réalisation des prises de sang et d'urines est minimisé par une contention efficace permettant la réalisation rapide du prélèvement par un personnel compétent.

Les chiennes Beagle seront logées en groupes et seront sorties quotidiennement en courettes extérieures. Leurs boxes sont enrichis de sorte à ce qu'elles disposent de lieux de repos, de tablettes leur permettant de grimper ou se reposer dessus.

11252 Ce projet se focalise sur les poissons grands migrateurs (saumon, truite, anguille, lamproies, aloses, etc.). Ces espèces emblématiques de la biodiversité des fleuves sont fragilisées par l'action de l'Homme. L'objectif de ce projet est de suivre sur le long terme ces espèces en milieu naturel afin de prévoir leur évolution sous l'effet des changements environnementaux (globaux et locaux) qui affectent ces écosystèmes.

Pour ce faire, un certain nombre de rivières, au niveau national et international, ont été retenues comme « rivières index ». Ces suivis se font via des dispositifs de capture ou d'échantillonnages tels que des stations de piégeage et des opérations de pêche électrique. Ces techniques sont mises en œuvre pour compter et observer ces animaux individuellement afin de recueillir des informations concernant leur taille, poids, sexe, croissance et comportement mais aussi pour prélever des échantillons de tissus pour des analyses génétiques et isotopiques afin d'alimenter nos collections et pouvoir réaliser des analyses rétrospectives.

L'objectif de ces suivis est d'étayer les connaissances sur la biologie et l'écologie de ces populations afin d'appliquer des mesures de gestion, de protection ou de suivis d'exploitation de ces espèces patrimoniales. Ces opérations alimentent des chroniques de données ou des collections longues de plusieurs décennies. Ces informations sont accessibles à l'ensemble des communautés scientifiques concernées et sont également utilisées par les organismes en charges de la gestion et la protection de ces espèces tant au niveau national (ONEMA, ONGs...) qu'eupéen (rapportages réglementaires, Conseil International pour l'Exploration de la Mer CIEM, North Atlantic Salmon Conservation Organization NASCO, etc.).

Afin de réaliser ces suivis, la manipulation des poissons est nécessaire pour récolter les données morphologiques telles que le poids, la taille ou le sexe. Un prélèvement de quelques écailles et d'un petit morceau de nageoire est également effectué. Pour réaliser ces manipulations dans de bonnes conditions, les animaux sont au préalable anesthésiés. Une partie d'entre eux sont ensuite marqués individuellement avant d'être remis dans la rivière. Le nombre total d'individus capturés fluctue de manière naturelle selon les années (entre 7000 et 22000 par an sur les 20 dernières années).

Règle des 3R :

Remplacement : Le remplacement par des modèles de prédiction est impossible car ce sont les suivis réalisés dans ce projet et sur les sites retenus qui permettent d'alimenter les modèles utilisés pour l'ensemble des cours d'eau français concernés.

Réduire : Afin de ne pas capturer l'ensemble de la population et de réduire le nombre de poissons concernés, nous disposons de protocoles d'échantillonnage qui nous permettent de cibler les individus en fonction de l'espèce et de leur classe de taille.

Raffinement : Toutes les précautions sont prises afin de limiter au maximum le stress de ces animaux notamment en veillant à utiliser des bacs de stockage suffisamment grands et en limitant les temps de manipulations.

11253 Le vieillissement cérébral normal engendre un déclin des fonctions cognitives (perte de mémoire, diminution des capacités d'apprentissage et de la reconnaissance spatiale) pouvant mener au développement de pathologies neurodégénératives. Il est associé à des caractéristiques physiopathologiques bien définies telles que la diminution des teneurs en acide docosahexaénoïque (DHA), l'induction d'une inflammation chronique à bas bruit ou encore la modulation de la neurogenèse due à des dysfonctionnements mitochondriaux. L'anxiété constitue également un facteur de risque dans le développement de démence et accélère le déclin cognitif. Ainsi, trouver des solutions permettant de vieillir le plus longtemps possible en bonne santé et avec une bonne qualité de vie est donc primordial et constitue un véritable enjeu économique, sociétal et de santé publique.

Plusieurs études épidémiologiques ont révélé que la consommation de poisson gras prévient ce déclin cognitif, pourtant les mécanismes restent encore peu connus. Les coproduits marins sont riches en acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série des n-3 (AGPI-LC n-3), en particulier en acide docosahexaénoïque (DHA), et en peptides bioactifs qui possèdent de nombreuses propriétés biologiques. Le DHA, doté de propriétés immunomodulatrices réduisant la production de cytokines inflammatoires et protégeant des altérations de la plasticité neuronale, constitue une stratégie de prévention de choix afin de retarder le déclin cognitif. Les peptides bioactifs contenus dans les hydrolysats de protéines issus de coproduits marins ont été démontrés, quant à eux, comme possédant de nombreuses propriétés biologiques dont des activités anxiolytiques, anti-inflammatoires et anti-oxydantes. Ces derniers semblent également prometteurs en termes de prévention du déclin cognitif. Malgré tout, leurs mécanismes d'action sont encore peu compris.

L'objectif du projet est d'étudier les mécanismes par lesquels le DHA, les phospholipides et les peptides bioactifs issus de têtes de poissons préviennent le déclin cognitif lié au vieillissement. Afin de permettre la compréhension de ces mécanismes, nous évaluerons ces effets d'une part à l'aide de paradigmes comportementaux permettant d'évaluer l'efficacité du mélange actif sur la mémoire des animaux ; et d'autre part à l'aide d'investigations neurobiologiques et moléculaires.

Des expériences *in vitro* ont permis de valider l'efficacité du mélange actif sur la neuroinflammation et la neuroprotection cependant l'étude de comportements de la mémoire et de type anxieux ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles *in vitro*. Ce projet de trois ans sera réalisé sur 288 souris mâles (jeunes et âgés). Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre plusieurs groupes. Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux la douleur (antalgiques avant anesthésie) et l'inconfort (manipulation régulière et enrichissement de l'hébergement) des animaux. Ainsi, nous respectons l'obligation réglementaire des 3 R : Remplacer, Réduire et Raffiner.

11254 L'alimentation des vaches laitières fortes productrices conduit aujourd'hui à utiliser des quantités importantes de concentrés protéiques comme les tourteaux d'oléagineux ou de protéagineux (près de 3 millions de tonnes en France chaque année). Pour satisfaire les besoins de synthèse des protéiques du lait, il faut compléter les rations de fourrages des vaches avec ces concentrés protéiques (sources alimentaires riches en protéines), qui sont importés (soja) ou sont coûteux à produire. L'Europe n'est pas autonome sur ces ressources puisqu'elle importe environ 70 % du soja ce qui pose un problème d'autonomie protéique et de durabilité de l'élevage laitier. De plus, ces

sources protéiques, ne permettent pas de parfaitement équilibrer les apports en acides aminés absorbés par l'animal, et sont en particulier déficitaires en lysine et méthionine. Un apport élevé dans ces sources protéiques permet d'éviter ces déficits en lysine et méthionine et la diminution de la production des protéines du lait. Cependant, un apport trop important de ces sources protéiques conduit à un excès d'apports des autres acides aminés favorisant ainsi leur catabolisme en urée et l'augmentation des rejets azotés urinaires, ce qui accroît les risques environnementaux. Réduire l'utilisation des concentrés protéiques comme les tourteaux tout en maintenant les performances zootechniques des animaux (d'ingestion, de production de lait et protéine du lait) est donc un enjeu fort. Il a été montré que l'on peut maintenir la production de protéines du lait en réduisant un peu l'apport de ces concentrés protéiques si l'on augmente l'apport dans la ration de la lysine et la méthionine. Cependant, on ne sait pas si l'apport de ces deux acides aminés permet aussi d'éviter la baisse de l'ingestion des vaches laitières observées lors d'une réduction plus importante de l'apport de ces sources de concentrés protéiques à l'animal. L'objectif de ce projet consiste donc à tester les progrès permis par la simple supplémentation de deux acides aminés, la lysine et la méthionine lors d'une réduction de ces apports en concentrés protéiques pour maintenir les performances zootechniques des animaux, en particulier sur l'ingestion, la production de protéines du lait et la diminution de la production d'urée indicatrice des rejets azotés dans l'environnement.

Un essai d'alimentation sera conduit sur 44 vaches laitières en production, représentatives de celles rencontrées dans les élevages. Ces travaux nécessitent des expérimentations *in vivo* car les réponses biologiques sur l'ingestion aux acides aminés ne peuvent être simulées précisément pour l'instant. Les résultats obtenus novateurs sur l'ingestion contribueront ainsi à développer les modèles de prévision nécessaires au principe de "remplacement" des 3R. L'essai sera mené en continu pour éviter les potentiels effets rémanents d'un des régimes alimentaires sur l'ingestion et le volume de lait avec quatre lots de 11 vaches équilibrés.

L'ingestion et la production de lait de chaque vache en réponse à une alimentation classique sera au préalable mesurée pendant une période pré-expérimentale. L'intégration de ces mesures préliminaires caractérisant chaque vache dans l'analyse statistique permet de réduire le nombre d'animaux à utiliser pour tester l'effet de la supplémentation en lysine et méthionine des régimes. Le nombre de prélèvements sur les animaux sera également réduit au minimum (trois prises de sang, une toutes les 15 jours). Ces deux derniers points permettront de répondre au principe de "réduction" des 3R. Enfin, une attention particulière sera portée au bien-être des animaux suivis (ingestion, état de santé général), et toute indication de mal-être des animaux conduira à les sortir de l'expérimentation, en accord avec le vétérinaire, respectant ainsi le principe de "raffinement" des 3R. Cette expérimentation se déroulera dans des conditions proches de celles d'un élevage classique, contribuant à élaborer des modèles mathématiques d'alimentation fiables pour transposer ces résultats expérimentaux dans des pratiques d'élevages laitiers et inciter à réduire l'utilisation des protéines

11255 Le premier objectif du projet est de faire le portrait moléculaire d'un œuf de bonne qualité (c'est-à-dire capable de permettre un bon développement) en effectuant une caractérisation exhaustive du transcriptome de l'œuf (transcriptome d'origine maternelle). Ce travail aura pour objectif de corrélérer le potentiel de développement de l'œuf avec l'effet des certains ARNs (Acides Ribonucléiques) qui sont transmis par la mère via l'œuf et qui permettent le développement précoce de l'embryon. Nous souhaitons démontrer l'importance de certains ARN maternels pour le succès du développement précoce en effectuant une approche de type knock-out (KO) qui vise à bloquer la traduction en protéine d'un ARN maternel particulier, annihilant ainsi sa contribution au développement de l'embryon. Le projet sera focalisé sur 5 ARNs maternels suite à des analyses transcriptomiques permettant de déterminer les expressions différentielles de l'œuf de bonne qualité et lesquelles joueraient un rôle prépondérant. Ce travail vise à promouvoir, à terme, la mise en place de marqueurs moléculaires génériques de la compétence au développement de l'œuf qui auraient des applications importantes en élevage, notamment pour les programmes de sélection.

Le nombre d'animaux nécessaires au projet est de 750 poissons ce qui correspond à 150 poissons pour chacune des 5 transcrits maternels étudiés. Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs :

- Remplacer : Il n'existe pas d'alternative *in vitro* car le processus étudié, (développement de l'ovocyte au sein de l'ovaire) ne peut être réalisé *in vitro*.

- Réduction : Le nombre d'animaux sera limité au minimum d'individus permettant de générer une lignée présentant l'absence de chacun des 5 ARNs d'intérêt tout en disposant d'un nombre suffisant d'animaux pour caractériser chacune de ces lignées.

- Raffiner : Les animaux seront anesthésiés dans les conditions réglementaires préalablement aux prélèvements de gamètes ou de génotypage. L'évaluation de la douleur est difficile chez le poisson. Contrairement aux mammifères, il n'existe pas de protocole anti-douleur publié chez le poisson qui permettrait d'utiliser une molécule antalgique de manière efficace et non toxique (rapport dose/efficacité/toxicité). L'appréciation de la douleur sera évaluée sur des bases comportementales.

11256 De nombreuses études scientifiques portent sur les effets sanitaires de l'exposition à des polluants pouvant être présents dans l'air que l'on respire. Il a été formulé l'hypothèse que le cerveau pourrait être un organe sensible lors de l'inhalation de contaminants sous forme de particules ; ce type d'exposition pourrait en effet entraîner des maladies neurodégénératives. La thématique de recherche relative à ce protocole porte sur un mode d'exposition spécifique à certaines situations professionnelles. Nous proposons d'étudier les effets biologiques induits par l'inhalation de particules de tungstène, présenté comme un contaminant émergent dans la littérature scientifique. Notre modèle expérimental repose sur des expositions *in vivo* aiguës et répétées à un aérosol de tungstène, suivies d'analyses des effets à court terme après l'exposition (4 et 24 heures). Les analyses réalisées permettront de mettre en évidence si l'exposition à ce type de particules métalliques induit une modification de paramètres biologiques liés à l'inflammation dans le cerveau et si la survie des neurones est altérée. Ces études viendront contribuer à l'accroissement des connaissances sur les effets potentiels de l'exposition à des polluants atmosphériques sur le cerveau et ainsi permettre à plus long terme la mise en œuvre de nouvelles normes de protection. La conception de ce protocole répond aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement relatives à l'expérimentation animale. Pour réaliser les expositions par inhalation, les animaux intégrés dans ce projet sont habitués progressivement aux procédures ce qui réduit significativement leur stress.

Afin de mimer une situation d'exposition réaliste à laquelle un homme pourrait être soumis, il apparaît pertinent d'utiliser un modèle *in vivo*. Ceci est particulièrement vrai dans la mesure où l'étude met en jeu des voies de transfert entre différents organes. Il s'agit d'interactions biologiques pour lesquelles il n'existe pas de modèle de culture cellulaire *in vitro* permettant d'étudier ces effets sur le cerveau entier.

L'espèce choisie est le rat car l'anatomie de son système olfactif et de son cerveau est suffisamment proche pour formuler une hypothèse extrapolable à l'homme à partir des résultats obtenus.

Le nombre de rats choisi pour ce protocole est réduit mais suffisant pour exploiter les résultats obtenus d'un point de vue statistique. Des expériences à l'aide d'un aérosol de particules de tungstène sont réalisées sur 300 rats Sprague-Dawley. En complément, 180 rats Sprague-Dawley sont exposés au tungstène par instillation nasale. Ce nombre (480) est nécessaire afin de mettre en œuvre les différentes techniques d'analyses biologiques suite aux expositions pour évaluer les effets sur l'inflammation cérébrale et la survie des neurones dans le cerveau.

Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale (suivi des animaux, hébergement en groupe avec enrichissement, habituation des animaux aux manipulations et équipements utilisés, anesthésie).

11257 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la principale cause de cécité non corrigée chez les personnes âgées en occident. On n'en connaît pas les causes et on ne sait la guérir. Il en existe deux formes : atrophique et exsudative qui peuvent coexister. La forme exsudative

correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux qui peuvent provoquer des hémorragies et la cécité. Les traitements existants (anti-VEGF, empêchant la formation de nouveaux vaisseaux) permettent de ralentir son évolution. Pour trouver de nouveaux traitements nous devons comprendre les mécanismes de la DMLA en général, et de la forme exsudative en particulier. Cette maladie, résultat d'une interaction complexe entre différents types cellulaires, ne peut être modélisée *in vitro*. Le syndrome d'apnée du sommeil (SAS) est une pathologie fréquente se caractérisant par la récurrence d'apnées durant le sommeil, induisant une hypoxie intermittente chronique (HIC). La forme la plus fréquente est le SAS obstructif, le plus souvent associé à une obésité. En raison de l'augmentation de l'obésité en occident, l'incidence de cette pathologie est amenée à croître. L'HIC au cours du SAS a été associée à une néovascularisation (NV) anormale. Il a également été suggéré une association entre DMLA réfractaire aux anti-VEGF et SAS. Nous pensons que le SAS pourrait aggraver l'apparition de néovaisseaux choroïdiens (NVC) et modifier leur réponse aux anti-VEGF.

L'utilisation du laser chez le rongeur est le modèle le plus utilisé pour « mimer » la DMLA exsudative. Afin d'étudier les mécanismes en amont et en aval de la NVC, nous soumettons nos modèles animaux à des impacts laser sous anesthésie générale afin de déclencher la NVC. D'un autre côté, pour mimer le SAS chaque animal sera placé dans une cage permettant de moduler les taux d'oxygène : les animaux seront placés dans des cages permettant de réaliser de courts épisodes d'hypoxie en abaissant le taux d'oxygène à 5% sur 30 secondes puis 30 secondes de normoxie (21% d'oxygène) 8 heures par jour, ce qui correspond au modèle utilisé pour mieux mimer le SAS. Les souris seront ensuite euthanasiées à différents temps pour analyses. Nous analyserons l'implication des différents acteurs cellulaires, leurs médiateurs chimiques en contexte hypoxique ainsi que l'effet de cette hypoxie sur la réponse aux anti-VEGF, et, une fois le mécanisme résolu, les animaux seront traités avec des inhibiteurs spécifiques issus des résultats de ces étapes pour développer de nouvelles thérapies.

L'utilisation du modèle animal est indispensable pour notre étude. Un total de 1920 souris sera nécessaire. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries et pesées 3 fois par semaine, des critères d'arrêts sont définies afin de limiter toute souffrance. Les conditions d'hébergements seront adaptées au modèle expérimental. Un anesthésique est utilisé pour l'utilisation du laser. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

11258 Les entérobactéries sont les causes les plus fréquentes d'infections communautaires ou nosocomiales. Elles sont généralement traitées par des bêta-lactamines (pénicillines, céphalosporines à large spectre, carbapénèmes). Au cours des deux dernières décennies, on observe une augmentation importante de la résistance des entérobactéries à ces antibiotiques, en particulier *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, ce qui pose un problème majeur de santé publique. Cette résistance est due à l'émergence d'enzymes capables d'hydrolyser les bêta-lactamines, les bêta-lactamases. Parmi les enzymes les plus préoccupantes, on retrouve les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE).

Les BLSE sont une grande famille très hétérogène d'enzymes bactériennes découverte dans les années 80. Elles confèrent aux bactéries, la capacité d'hydrolyser une grande variété de pénicillines et de céphalosporines. La majorité des BLSE sont le résultat de mutations génétiques de bêta-lactamases naturelles, en particulier de TEM-1, TEM-2 et SHV-1. Elles sont très actives contre les pénicillines et moyennement actives contre les céphalosporines de première génération. Les mutations génétiques à l'origine des BLSE élargissent le spectre de ces enzymes et touchent également les céphalosporines de troisième génération (ceftazidime et céfotaxime) et les monobactames (aztréonam), ce qui entraîne des infections très difficiles à traiter, pour lesquelles les carbapénèmes sont utilisés comme traitement de dernier recours.

Face à l'augmentation continue des résistances bactériennes, il apparaît donc indispensable d'évaluer de nouvelles molécules.

Le but de notre étude est d'évaluer l'activité *in vivo* d'un nouvel antibiotique dans le modèle d'infection de cuisse *E. coli* et *K. pneumoniae*, chez la souris neutropénique.

Pour cela, 528 souris Swiss femelles vont être utilisées.

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

- Remplacer : l'évaluation et la comparaison de l'activité d'un antibiotique sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées de façon *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*).

- Réduire : Les premiers temps de l'expérimentation consistent à la validation du modèle avec les souches à étudier, ce qui permet d'utiliser le moins d'animaux possible lors de l'évaluation thérapeutique proprement dite. Pour les évaluations thérapeutiques, le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable.

- Raffiner :

- Avant l'expérimentation :

- o Conditions d'hébergement : Acclimatation des animaux durant une semaine avant l'expérimentation. Assurance d'une non surpopulation dans la salle d'hébergement. Les animaux sont conservés dans des cages répondant aux dernières normes, enrichies de frisottis. La litière est changée une fois par semaine avec accès libre à l'eau et à la nourriture (alimentation spécifique pour rongeur).

- o Détermination des points limites : figure 4, annexe 1.

- Pendant l'expérimentation :

- o Soins pré et postopératoire : Les souris reçoivent une injection sous cutanée de 30µL de buprénorphine (0,05mg/kg) 30minutes avant l'infection puis 8h après.

- o Evaluation des signes généraux : Application des points limites (cf raffinement avant expérimentation)

- o Euthanasie : dislocation cervicale après pré anesthésie par inhalation d'isoflurane.

Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long de l'étude.

11259 La transplantation est la solution thérapeutique lors d'une perte fonctionnelle d'un organe. Les traitements immunosuppresseurs permettent un maintien à long terme du greffon mais de nombreuses autres stratégies immunomodulatrices sont en cours de développement pour, notamment, diminuer les effets secondaires des traitements et augmenter leur efficacité. L'induction de la tolérance immunitaire reste le « SaintGaal » dans la transplantation d'organe. Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules centrales dans l'homéostasie de la réponse immunitaire. Notre projet consiste à tester une molécule ciblant *in situ* les différentes DCs, avec des anticorps bispécifiques (Ac), pour induire un statut tolérant ou anti-inflammatoire chez l'homme. Ces anticorps sont dirigés contre des molécules humaines et pour prouver leur efficacité nous prévoyons de les tester *in vivo* dans des modèles précliniques mimant le système immunitaire humain, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies chez la souris humanisée.

Dans cette saisine, la règle des 3R sera suivie de la façon suivante :

- Remplacer : Les molécules que nous souhaitons tester *in vivo* ont déjà été validées *in vitro*. Cependant le passage aux modèles *in vivo* est indispensable pour définir leurs effets dans des contextes inflammatoires plus complexes. A notre connaissance, il n'existe pas à ce jour de modèle *in vitro* mimant la situation complexe que constitue le système immunitaire humain c'est pourquoi nous avons besoin d'utiliser un modèle de souris humanisées.

- Réduire : Puisqu'il n'existe pas d'autres modèles complexes pour valider l'effet de nos anticorps, les données issues de ce projet devront donc être suffisamment robustes (c'est-à-dire validées avec tests statistiques). Nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques (Test de Mann-Whitney) car nous ne pourrions pas nous assurer d'une distribution normale ($n < 30$). Nombre total d'animaux = 230 souris. Notre première procédure a pour but d'évaluer l'efficacité et la dose de l'Ac à utiliser ($n=50$ souris), notre seconde procédure permettra d'analyser, à la dose précédemment établie dans la procédure 1, le développement de Treg ($n= 80$ souris). Enfin notre dernière

procédure testera l'efficacité thérapeutique des Ac (n=100 souris). Le nombre de souris inclus dans les procédures comprend non seulement le groupe de souris dans lequel le produit est testé mais également des groupes contrôles (témoins positifs et négatifs) essentiels à l'interprétation des résultats.

- Raffiner : Les animaux seront suivis quotidiennement lorsque les cellules humaines seront injectées et les signes cliniques notables et sévères décrits dans le tableau en annexe de cette saisine seront notés. Lorsque deux signes cliniques notables seront présents alors il sera administré deux fois par jour une dose de morphinique (buprénorphine 0.05mg/kg en sous cutané), puis lorsque 3 signes cliniques notables ou un seul signe clinique sévère seront notés alors les animaux seront sortis du protocole et euthanasiés. Tous les animaux seront analysés post-mortem avec des prélèvements d'organes en vue d'études immunohistochimiques ou histologiques permettant de caractériser au mieux l'effet des molécules testées.

11260 La prévention et le traitement des maladies infectieuses et des cancers constituent une préoccupation importante en santé publique. Contrairement à la vaccination dite « classique » qui stimule le système immunitaire par la présentation d'une forme atténuée ou inactivée d'un agent infectieux et induit des anticorps capables de neutraliser ce dernier, d'autres approches consistent à stimuler en complément la réponse immunitaire cellulaire afin d'éliminer les cellules infectées. L'une d'elles s'appuie sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux (VL). Ces vecteurs, modifiés pour être non-réplicatifs et non-pathogènes, permettent l'expression d'un gène vaccinal dans des cellules du système immunitaire qui sont des acteurs clés dans la mise en place d'une réponse immunitaire anti-infectieuse mais également anti-tumorale.

L'objectif du projet est d'évaluer l'immunogénicité de nouveaux candidats vaccins basés sur la technologie des VL, c'est-à-dire leur capacité à induire une réponse immunitaire vis-à-vis de différentes pathologies avec, pour finalité, une preuve de concept en vue d'une évaluation clinique. Les candidats vaccins concerneront neuf maladies infectieuses (la malaria, la tuberculose, l'hépatite B, la fièvre jaune, le SIDA (humain et simien) et la fièvre du West Nile) ou cancéreuses (le cancer induit par le papillomavirus et le cancer urogénital).

Deux procédures expérimentales, de sévérité légère, consisteront à évaluer l'immunogénicité des candidats vaccins. L'administration de VL devra induire une réponse primaire forte et multi-spécifique ainsi qu'une réponse mémoire efficace. Ces deux procédures permettront de valider les séquences vaccinales véhiculées par VL ainsi que la dose d'injection et le laps de temps optimal nécessaire avant d'effectuer une injection de rappel. Ces réponses doivent être évaluées dans un organisme vivant du fait de la complexité des phénomènes impliqués. De plus, comme pour tout produit expérimental dont l'objectif final est une utilisation chez l'homme, des études sur des modèles précliniques sont requises par la réglementation relative à la demande d'autorisation d'essai clinique. Les VL seront évalués chez des souris consanguines puis chez des rats non consanguins. En effet, grâce à un fonds génétique constant, les souris consanguines permettront une sélection rapide des meilleures constructions vaccinales. L'utilisation des rats permettra de confirmer l'immunogénicité des VL dans une autre espèce et un fonds génétique non consanguin. Des expériences préliminaires dans notre laboratoire montrent que les injections de VL n'induisent aucune pathologie chez la souris et le rat et seulement deux prélèvements de sang seront effectués lors des procédures. Les expériences ne nécessitent aucune médication et seront réalisées par des expérimentateurs formés. Aucun dommage pour les animaux n'est donc attendu, cependant si des signes cliniques sont observés lors de la surveillance, les animaux seront euthanasiés. Les groupes d'animaux seront constitués de souris et de rats adultes femelles afin d'éviter la variabilité inter-sexe sauf dans le cas du cancer de la prostate où des individus mâles seront utilisés. Les données obtenues permettront de statuer sur la possibilité d'un développement clinique du candidat pour chaque indication.

Nous estimons à 1765 le nombre de souris et 1765 le nombre de rats maximum nécessaires à la réalisation de ce projet sur une durée de 5 ans. Afin de respecter la règle des 3R, Les séquences vaccinales à insérer dans le VL seront déterminées à l'aide de programmes informatiques capables de prédire les régions capables d'induire une réponse immunitaire et permettra ainsi de réduire le

nombre de constructions vaccinales à tester *in vivo*. De plus, ces constructions seront ensuite validées *in vitro* sur cellules de manière à n'évaluer *in vivo* que les VL présentant le plus d'intérêt pour l'indication visée. Le nombre d'animaux à utiliser a été déterminé avec l'aide d'un biostatisticien et des tests statistiques de type ANOVA seront réalisés pour déterminer la significativité de nos résultats.

11261 Les stéatoses hépatiques non alcooliques (NAFLD) sont les maladies hépatiques les plus fréquentes dans les pays industrialisés, associées à l'obésité et au diabète de type 2. La stéatose se caractérise par une accumulation de graisses dans les cellules du foie (les hépatocytes). Bien que souvent asymptomatique, cette accumulation peut entraîner une réponse inflammatoire appelée stéato-hépatite non alcoolique (NASH) qui favorise l'apparition d'une cirrhose et dans certains cas le développement d'un cancer du foie (hépatocarcinome ou CHC). La présence de stéatose est rapportée sur environ 20 à 30% des biopsies hépatiques réalisées dans la population générale, et celles de la NASH dans 2 à 3 %. La définition correspond à des lésions, comparables à celles objectivées lors des intoxications alcooliques chroniques, en l'absence de prise significative d'alcool (> 20 à 30 g/j chez l'homme, > 20 g/j chez la femme), ou d'association à d'autres maladies hépatiques chroniques (virales ou toxiques). Les lésions de stéatose sont classiquement notées chez la majorité des malades obèses (60 à 75%), diabétiques (21 à 78%) et avec un taux élevé de lipides dans le sang (50 %). Les lésions de NASH sont objectivées chez environ 20% des malades obèses. Cependant les lésions de NASH peuvent également être notées chez des malades sans surpoids (3%), ni diabète patent. Ces lésions vont de la simple stéatose qui possède une évolution bénigne, à des lésions de stéato-hépatites dites évolutives et qui sont responsables de l'apparition d'une fibrose hépatique et de véritable cirrhose pouvant se compliquer en cancer du foie. La NASH n'est pas le résultat d'une lésion en particulier, mais plutôt la « co-existence » de plusieurs lésions incluant une stéatose, une dégénérescence des cellules du foie et des infiltrations de cellules inflammatoires dans le foie. Les mécanismes conduisant au développement de la NASH n'ont, à ce jour, pas été formellement élucidés et l'hypothèse d'une pathologie multifactorielle reste la plus probable. Ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de la NASH est devenue un enjeu majeur de santé publique. Il a été montré que l'augmentation de l'expression du récepteur TREM-1 au niveau des cellules inflammatoires dans le foie était corrélée à la sévérité de l'inflammation de la NASH et par conséquent, son inhibition pourrait être une nouvelle approche thérapeutique.

Ce travail fait suite à un projet démarré en 2018 et pour lequel nous avons obtenu des résultats encourageants qui montrent effectivement que le peptide antagoniste de TREM réduit significativement la fibrose, consécutive à l'apparition de la NASH elle-même induite par un régime alimentaire spécifique. Cependant, durant la réalisation du protocole, les souris ont subi une perte de poids importante. Pour diminuer cette perte de poids qui n'est pas un signe clinique habituel de la NASH, nous souhaitons augmenter le taux de lipides dans la nourriture jusqu'à 60% en se basant sur une publication (Chiba et al., 2016) où ils ont introduit pendant 12 semaines un régime carencé en méthionine et choline mais high fat. Ils ont trouvé un score de fibrose plus élevé ainsi qu'une perte de poids moins prononcée qu'un régime MCD où le taux de lipide est de 20%.

Dans cette étude, nous voulons donc évaluer le potentiel thérapeutique d'un peptide inhibiteur de TREM-1 pour le traitement de la NASH chez la souris. Pour cela, nous souhaitons utiliser un organisme vivant pour tester le(s) effet(s) du peptide sur les différents symptômes que représente la NASH. A ce jour, la souris reste le meilleur modèle représentatif de la NASH rencontré chez l'homme et ainsi les résultats de cette étude pourraient représenter les premiers éléments du développement d'une nouvelle thérapie pour la NASH chez les patients.

1. Remplacement : Il n'existe aucune approche *in vitro* qui pourrait nous permettre d'étudier le rôle de TREM-1 dans le développement d'une pathologie inflammatoire chronique multifactorielle comme la NASH. Une étude chez un organisme vivant est indispensable pour mettre en évidence l'effet de l'inhibition de TREM-1 sur l'ensemble des paramètres (système immunitaire, microbiote intestinal, etc...) contribuant au développement de la NASH et évaluer réellement le potentiel thérapeutique du peptide.

2. Réduction : l'étude sera réalisée avec un nombre total de 40 animaux afin de constituer les différents groupes d'analyses. Chaque groupe comportera 8 animaux : un nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, au vu des analyses qui seront conduites à partir de ces animaux.

3. Raffinement : Dès leur réception, les animaux auront une période d'acclimatation d'une semaine pour s'adapter à leur nouvel environnement. Ils seront hébergés dans une animalerie dotée de tous les paramètres nécessaires (température, hygrométrie, filtration de l'air, ...) à leur bien-être. La pathologie (NASH) sera induite par l'administration d'un régime alimentaire high fat carencé en méthionine et choline durant 10 semaines. Cette méthodologie est fréquemment utilisée pour induire une NASH expérimentale représentative de celle observée chez l'homme. Le traitement thérapeutique sera réalisé par injection intra-péritonéale quotidienne du peptide durant 2 semaines par un personnel technique qualifié. Le peptide utilisé a déjà montré ses effets bénéfiques dans le traitement d'autres pathologies comme le choc septique et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Par ailleurs, une procédure d'estimation (avec des paramètres définis) et suppression de la souffrance sera mise en place. Le point limite sera fixé à 20% de perte du poids corporel avec identification des signes de mal-être définis au préalable par notre vétérinaire référent. En fin de protocole, les animaux seront euthanasiés et des prélèvements d'organes seront effectués pour permettre de réaliser les analyses biochimiques.

11262 Le syndrome de Brugada (SBr) est une maladie cardiaque rare (1/2000) caractérisée par un sus-décalage du segment ST sur les dérivations précordiales droites (V1-V2) de l'électrocardiogramme et un risque élevé de fibrillation ventriculaire et de mort subite. Cette maladie génétique affecte plus fréquemment les hommes (80% des cas). Les événements arythmiques surviennent généralement sur des sujets jeunes, avec un pic entre 35 et 40 ans. Récemment, une mutation (p. R211H) sur le gène RRAD, qui code la petite protéine G monomérique Rad (Ras associated with diabetes), a été identifiée par notre laboratoire chez six patients d'une même famille présentant un SBr. D'autres mutations de ce gène ont depuis été identifiées chez d'autres patients. Afin d'identifier les mécanismes physiopathologiques aboutissant aux anomalies électriques cardiaques en présence de la mutation p.R211H, nous avons généré un modèle de souris knock-in (souris KI) porteuse de la mutation équivalente, p.R210H, à l'état hétérozygote (HET), la pathologie chez l'homme étant transmise sur un mode autosomique-dominant. La caractérisation du modèle de souris KI, aux âges de 9-11 semaines et de 29-31 semaines, n'a montré que des défauts mineurs de la conduction ventriculaire et une absence de défauts structuraux, un phénotype plus léger que celui des patients. Sur cette base, nous souhaitons prolonger nos investigations jusqu'à l'âge de 49-51 semaines et ajouter à notre étude un groupe de souris homozygotes (HOMO) pour la mutation.

Cette étude sera réalisée en 3 étapes.

1. La première consistera à réaliser une étude électrocardiographique (ECG de surface 6 dérivations et échocardiographique sur 20 souris KI HET (10 mâles et 10 femelles), 20 souris KI HOMO (10 mâles et 10 femelles) et 20 souris sauvages (10 mâles et 10 femelles). Les ECG seront enregistrés sous anesthésie sur les mêmes souris à l'âge de 9-11 semaines puis à l'âge de 29-31 semaines, et enfin à l'âge de 49-51 semaines, en condition basale et après injection d'ajmaline (20 mg : kg ip), un inhibiteur du canal sodique cardiaque utilisé en clinique pour le diagnostic du SBr. Cette étude permettra de déterminer si la mutation de Rrad entraîne des anomalies de l'ECG. Elle permettra également de vérifier si ces éventuelles anomalies sont plus marquées chez les mâles que chez les femelles, comme c'est souvent le cas chez les patients.

Une semaine après le second et le dernier ECG, une échocardiographie sera réalisée pour déterminer si la mutation de Rrad entraîne éventuellement des anomalies structurales et contractiles. Celle-ci sera réalisée sous anesthésie.

2. La seconde étape consistera à réaliser une exploration électrophysiologique, endocavitaire par cathétérisme cardiaque. Ces expérimentations seront réalisées sur 10 souris KI HET, 10 souris KI HOMO et 10 souris sauvages à l'âge de 29-31 semaines ou de 49-51 semaines selon les résultats obtenus lors de l'étape 1 avec les souris KI HOMO. En fonction des résultats obtenus lors de la première étape, ces lots seront composés soit de mâles, soit de femelles, selon le sexe présentant

les défauts ECG les plus marqués. S'il n'existe pas de différence entre les sexes, les lots comprendront 5 mâles et 5 femelles. L'exploration endocavitaire, réalisée sous anesthésie et analgésie au site d'insertion veineuse du cathéter, en condition basale et après injection d'ajmaline, permettra de déclencher des arythmies par stimulation programmée, comme cela est réalisé chez les patients.

3. Enfin, si les deux étapes précédentes montrent que la mutation induit effectivement des anomalies ECG, nous enregistrerons l'ECG en continu sur des souris vigiles implantées avec un capteur télémétrique. Les capteurs seront implantés sur 10 souris KI HET, 10 souris KI HOMO et 10 souris sauvages à l'âge de 10 semaines. L'intervention chirurgicale sera réalisée sous anesthésie. Une analgésie péri-opératoire et post-opératoire sera mise en place. Les souris seront suivies jusqu'à l'âge de 50 semaines. La composition de ces lots sera basée, comme pour l'étape 2, sur les résultats obtenus lors de la première étape. L'ECG par télémétrie permettra de quantifier les défauts électrophysiologiques et l'incidence éventuelle d'arythmies ventriculaires spontanées (extrasystoles, tachycardie...) sans interaction avec un protocole d'anesthésie, d'une part, et, d'autre part, en fonction du rythme nyctéméral. En effet, les arythmies associées au SBr sont plus fréquentes au repos et la nuit.

Respect de la règle des 3R.

Réduction. Il est envisagé d'utiliser 60 souris pour l'étape 1 et 30 souris pour l'étape 2. L'étape 3, si elle est réalisée, nécessitera 30 souris. Au total, un maximum de 120 souris sera donc nécessaire à la réalisation de cette étude. Au fur et à mesure de l'inclusion des données, des analyses statistiques seront réalisées. Si une différence statistiquement significative entre les souris sauvages, les souris KI HET et les souris KI HOMO apparaît avant la fin des différentes expérimentations, celles-ci seront interrompues.

Si les examens électrocardiographiques (étape 1) et les explorations endocavitaires (étape 2) ne montrent pas de différences entre souris sauvages et souris KI HOMO, les expériences de télémétrie ne seront pas réalisées.

Remplacement. Cette étude fait suite à une étude *in vitro* réalisée avec des cardiomyocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes induites des patients qui a permis d'identifier des anomalies de l'activité électrique cellulaire et ses mécanismes moléculaires. Cependant, les arythmies cardiaques sont des maladies complexes résultant des interactions entre les cardiomyocytes, dont l'activité électrique est altérée, les fibroblastes cardiaques (70% des cellules cardiaques) et le système nerveux autonome. Ce niveau d'intégration ne peut être obtenu que sur un modèle animal.

Raffinement. Les souris seront hébergées en cages ventilées enrichies de tunnels pour se camoufler, ou de papier pour réaliser des nids. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie avec une prise en charge analgésique adaptée à chaque technique.

11263 En élevage, l'activité physique est l'une des principales composantes de la variation des performances des animaux. Les conditions d'élevage peuvent générer de grandes différences entre les animaux, selon la taille du groupe, la surface allouée, les conditions d'ambiance et d'alimentation. Il en résulte des différences dans les performances des animaux, à cause d'une utilisation de l'énergie de l'aliment à des fins non productives. Le développement de systèmes d'alimentation automatisée et de dispositifs de télémétrie pour la mesure de l'activité physique des animaux permet aujourd'hui de prendre en compte les différences entre animaux pour adapter individuellement la composition de la ration et la quantité allouée en fonction des besoins réels des animaux. Pour cela, il est nécessaire de connaître la dépense énergétique des porcs en fonction de leur activité physique. Si cette dépense est bien connue chez les animaux immobiles, il existe aujourd'hui très peu de valeurs pour des animaux en déplacement. L'objectif du projet est donc de mesurer la dépense énergétique liée à l'activité physique des porcs dans des conditions de déplacement. Le projet sera conduit à deux stades de croissance (environ 50 et 100 kg de poids vif), avec 16 animaux à chaque stade (au total : 32 animaux). Les animaux seront d'abord entraînés à marcher sur un tapis roulant (vitesse variant de 2 à 8 km/h) pendant une durée de 20 minutes au

cours de deux semaines (une séance d'entraînement par jour, 2 à 3 jours par semaine). Chaque porc sera ensuite placé en chambre respiratoire sur le tapis roulant pour 3 séances de mesure de la dépense énergétique en fonction de la vitesse du tapis (2, 5 ou 8 km/h). Chaque séance aura une durée de 20 minutes et une seule séance sera effectuée par jour.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de caractériser la dépense énergétique des animaux en fonction de leur activité physique. Réduction : le nombre d'animaux et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin de disposer de suffisamment de mesures tout en limitant le nombre d'animaux. Raffinement : Les séances de mesures seront toutes réalisées sous contrôle visuel des animaux. A la sortie de la chambre respiratoire après les phases de course sur le tapis roulant, le rythme cardiaque sera mesuré afin de contrôler l'état des animaux. En dehors des périodes de mesures, les animaux seront hébergés en groupe avec leurs congénères. Tous les animaux sont maintenus en vie à la fin du projet.

11264 Lorsqu'il s'agit d'une lésion nerveuse, la repousse nerveuse après la réparation se fait chez l'Homme à une vitesse d'un millimètre par jour et elle ne commence que 1 mois après la lésion.

La vitesse de repousse nerveuse est un facteur particulièrement important car plus la lésion nerveuse est loin du muscle dénervé et plus le temps nécessaire pour la ré-innervation de ce muscle est long. Ainsi il faut attendre quelquefois jusqu'à 24 mois pour qu'un muscle retrouve sa fonction. Un muscle dénervé s'atrophie et au-delà de ce délai maximum des 2 ans il perd sa capacité à se réinnover. C'est pourquoi le temps de repousse est extrêmement important. Si on pouvait l'accélérer on pourrait espérer une convalescence plus rapide et une meilleure fonction.

Des travaux récents concernant les réactions moléculaires lors de la régénération nerveuse mettent en évidence les faiblesses et les limites des greffes nerveuses conventionnelles. Depuis plusieurs dizaines d'années on tente de chercher à améliorer la qualité de réparation ainsi que la vitesse de la repousse nerveuse.

La plupart des travaux scientifiques ont évalué les influences des facteurs de croissance *in vitro*. Ils ont démontré une influence des facteurs de croissance nerveuse sur le développement du tissu nerveux et la formation des axones.

Les essais *in vitro* expliquent les phénomènes d'interaction entre les facteurs de croissance externes et le tissu nerveux, mais les conditions *in vivo* sont différentes, il y a beaucoup plus de facteurs à prendre en compte, c'est pourquoi afin de vérifier l'hypothèse d'influence positive des facteurs de croissance sur la régénération nerveuse périphérique il faut passer à l'étape *in vivo*.

Plusieurs facteurs sont importants dans la régénération nerveuse : la matrice (certaines protéines et certains types de collagène), facteurs de croissance (en injection continue, car la durée de vie dans les tissus est très courte), absence des inhibiteurs (présents pendant un mois après la section du nerf périphérique).

La méthodologie de notre travail scientifique cherche à dresser l'ensemble de ces facteurs importants.

Le but du projet est de créer *in vivo* un modèle de greffe nerveuse en injectant en continue des facteurs de croissance et ainsi voir si ce modèle peut permettre d'accélérer la vitesse de repousse nerveuse. Pour atteindre ces objectifs 18 animaux (porcs) seront utilisés.

Le choix de l'animal est motivé par la physiologie du porc proche à l'humain, mais aussi par la taille (longueur) plus importante des nerfs périphériques – cela correspond au design de l'étude où une longueur de 10cm du nerf périphérique sera nécessaire.

Il est admis que le nombre d'animaux ne doit pas être inférieur à six par groupe, ce qui doit permettre d'avoir les résultats statistiquement fiables. Tout dépendra de la dispersion des données, mais ce facteur ne sera connu qu'après le recueil des données. Dans la littérature sur les études comparables, le nombre d'animaux par groupe se situe autour de six animaux.

La vitesse de régénération sera comparée dans 3 différents groupes. Les animaux seront opérés sous anesthésie générale. Le modèle de régénération nerveuse périphérique utilisé sera le

remplacement d'un défaut de nerf sciatique par des fibres musculaires associées à des facteurs de croissance (NT4). Les facteurs de croissance seront injectés de façon continue par pompe osmotique, système préalablement évalué en ex-vivo. Les animaux seront gardés en vie pendant un mois, une analgésie post-opératoire par patch de morphine est prévue. Ensuite, 30 jours plus tard les animaux seront à nouveau anesthésiés puis euthanasiés par surdosage anesthésique et les greffons nerveux seront prélevés pour des analyses histologiques. La longueur de nouveau nerf en cours de régénération sera mesurée. Ce travail pourra valider ou invalider l'hypothèse d'influence positive des facteurs de croissance délivrés en continu sur la vitesse de régénération nerveuse.

Les contraintes imposées aux animaux sont modérées et ne devraient pas induire de modification de leur bien-être.

Les animaux seront surveillés bi-quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales seront observés tout au long des expériences.

11265 Les maladies cardiovasculaires (MCV), majoritairement représentées par les accidents thrombotiques de type accidents vasculaires cérébraux et infarctus du myocarde, sont la première cause de mortalité dans le monde. À elles seules, les MCV ont été responsables d'environ 17,9 millions de décès en 2015 selon l'Organisation Mondiale de la Santé, soit 31% de l'ensemble des décès. L'identification et la caractérisation précise des molécules impliquées dans les processus thrombotiques et athérotrombotiques constituent dès lors une étape importante pour identifier de nouvelles cibles pharmacologiques et développer de nouveaux outils thérapeutiques plus efficaces. Ce projet de recherche a pour objectif d'étudier le potentiel anti-thrombotique d'un nouvel agent médicamenteux inhibant l'interaction entre une protéine identifiée comme étant impliquée dans les processus thrombotiques et son récepteur situé à la membrane des cellules.

Dans une première procédure, le potentiel anti-thrombotique de cette molécule sera évalué par vidéo-microscopie intra-vitale dans un modèle murin d'athérotrombose, dans lequel la rupture d'une plaque d'athérome pré-formée au niveau de l'artère carotide sera induite grâce à une sonde à ultrasons. Ces souris, modifiées génétiquement pour être davantage sensibles à la formation de plaque d'athérome, auront été préalablement nourries avec un régime riche en graisse pendant 20 semaines afin de permettre la formation de ladite plaque. Afin de s'affranchir de toute souffrance, les souris seront maintenues sous anesthésie générale durant l'ensemble de la procédure expérimentale d'induction puis de visualisation de la formation du thrombus.

Ce modèle expérimental est déjà reconnu dans la littérature scientifique puisqu'il a permis de caractériser des acteurs moléculaires clefs impliqués dans la mise en place des pathologies cardiovasculaires.

Une deuxième procédure consistera à maintenir et amplifier deux lignées murines :

- Une lignée déficiente pour le gène codant une protéine impliquée dans le transport des lipides dans l'organisme, favorisant ainsi la formation de plaque athéromateuse chez ces souris.
- Une lignée déficiente pour le gène codant la protéine ciblée par notre molécule candidat médicament.

Dans la première procédure *in vivo*, un nombre limité de quatre souris par condition expérimentale sera considéré pour une étude préliminaire qui permettra de juger de la nécessité de poursuivre l'expérimentation. Cette étude servira également à déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir un résultat statistiquement significatif avec un nombre maximal considéré de 12 souris pour chacune des conditions expérimentales suivantes (en incluant les souris de l'étude préliminaire) :

- Injection rétro-orbitaire du candidat médicament.
- Injection rétro-orbitaire d'un peptide contrôle inactif.
- Injection rétro-orbitaire de sérum physiologique.
- Injection rétro-orbitaire d'un anticorps bloquant utilisé comme traitement de référence.
- Injection rétro-orbitaire d'un anticorps contrôle inactif.

En cas de résultat démontrant un effet anti-thrombotique significatif du candidat médicament, il conviendra de s'assurer de la spécificité de cet agent innovant vis-à-vis de sa cible moléculaire. Pour cela, il sera nécessaire de reproduire cette même procédure avec des souris possédant le même fond génétique mais déficientes pour le gène codant la protéine ciblée. Par souci de reproductibilité, un nombre maximal de 12 souris par condition expérimentale sera également considéré.

Cette première procédure est donc susceptible d'inclure un nombre maximal de 96 souris :

— Étude préliminaire : 4 souris x 5 conditions x 1 génotype soit 20 souris.

— Poursuite de l'étude avec les souris déficientes pour le gène codant une protéine impliquée dans le transport des lipides : 8 souris x 5 conditions soit 40 souris.

— Poursuite de l'étude avec les souris également déficientes pour le gène codant la protéine ciblée par notre candidat médicament : 12 souris x 3 conditions (anticorps inactifs chez ces souris) soit 36 souris.

Par souci de reproductibilité et afin de s'affranchir d'une variable biologique supplémentaire, uniquement des souris mâles seront considérées (pas d'influence du cycle menstruel).

L'analyse statistique sera réalisée par le test non paramétrique U de Mann-Whitney dans sa configuration bidirectionnelle.

Actuellement, aucun modèle de substitution n'existe pour mesurer l'effet d'une substance sur le phénomène complexe, multifactoriel et multicellulaire, qu'est la thrombose artérielle induite suite à une rupture de plaque. Nous n'avons donc pas d'autre choix que d'utiliser un modèle animal pour apporter la preuve de concept de l'efficacité thérapeutique de notre molécule.

Une anesthésie des animaux sera maintenue durant toute la durée de l'expérience (sans réveil) afin de prévenir tout type de souffrance. Dans un souci de limiter le stress des animaux, les cages seront enrichies de divers équipements d'activité (tubes de jeu en carton, niche, papier, etc.). Les souris recevant un régime riche en graisses seront susceptibles de présenter le phénotype délétère associé à l'obésité. La surveillance de leur bien-être consistera à vérifier notamment qu'elles ne présentent pas de difficultés handicapantes à la locomotion leurs empêchant d'accéder à l'eau ou à la nourriture.

À terme, la réalisation de ce projet scientifique pourrait mener au développement d'un nouveau traitement des pathologies thrombotiques.

11266 La schizophrénie (SCZ) fait partie des maladies psychiatriques les plus sévères et touchent environ 1% de la population. Les premiers épisodes psychotiques ont lieu pendant l'adolescence, période critique pour la maturation du cerveau et particulièrement sensible aux perturbations extérieures. L'émergence des psychoses résulterait d'une action combinée de deux altérations : une altération précoce du développement cérébral, et une altération environnementale plus tardive (parmi lesquelles l'exposition au cannabis). Malheureusement, les mécanismes précis mis en jeu sont encore mal connus.

La mise en évidence fréquente d'anomalies neuro-anatomiques, fonctionnelles ou cognitives chez des patients schizophrènes a naturellement conduit à une hypothèse neuro-développementale pour l'étiologie de cette maladie. Cette hypothèse s'appuie sur des anomalies structurelles cérébrales observées dans le cortex, et plus particulièrement le cortex frontal. Selon des études épidémiologiques rétrospectives, ces anomalies seraient des séquelles de perturbations précoces du développement cérébral intervenues lors de la vie fœtale ou périnatale.

Des découvertes récentes soulignent le rôle important de plusieurs populations cellulaires transitoires dans ces processus de développement précoce du cerveau. Ainsi les cellules Cajal-Retzius (CR) jouent un rôle essentiel dans le développement du cortex et leur persistance et/ou leur distribution anormale pourraient jouer un rôle dans le développement de la SCZ.

Le projet propose d'évaluer la contribution des cellules de Cajal-Retzius (CRs) dans l'étiologie de la SCZ grâce à deux modèles génétiques murins présentant des défauts du développement cérébral résultant de l'altération de la distribution ou de la survie de ces cellules. Pour cela nous

utiliserons différentes techniques *in vivo* et *ex vivo* (électrophysiologie, étude du comportement et histologie) qui ne peuvent être remplacées par des méthodes substitutives.

Nous prévoyons d'utiliser 2112 animaux sur 5 ans.

Notre projet met en jeu des procédures chirurgicales, d'administration de substances pharmacologiques avant étude physiologique ou anatomique et une évaluation des comportements s'apparentant à l'anxiété, la dépression, la psychose ainsi que l'évaluation des fonctions cognitives des souris à l'aide de différents tests comportementaux. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Pour éviter toute souffrance les procédures de chirurgie et de prélèvement se feront sous anesthésie générale. Les animaux seront observés quotidiennement et évalués à l'aide de points limites bien définis.

Les résultats attendus permettront d'améliorer l'évaluation des risques de développer une SCZ chez les adolescents présentant des difficultés psychiques et d'adapter leur prise en charge. Par ailleurs, la meilleure compréhension moléculaire et cellulaire du déclenchement de la SCZ permettra d'envisager des soins spécifiquement adaptés à ces sujets et une action préventive.

11267 Des travaux épidémiologiques ont démontré que la consommation de viandes rouges et charcuteries est associée chez l'adulte à une augmentation du risque de cancer du côlon. Un des mécanismes proposés sur la base de travaux expérimentaux conduits chez le rongeur repose sur l'hypothèse suivante : le fer héminique contenu dans la viande induit la formation d'alcénals, à savoir des produits de peroxydation des lipides, responsables d'une altération de l'écosystème colique (dont le microbiote) à court terme, et de la formation d'adénocarcinomes à plus long terme.

Les conséquences d'une exposition d'origine maternelle à ce stress nutritionnel sur la descendance sont en revanche totalement méconnues à ce jour. Il s'agit donc d'évaluer l'impact de la consommation d'un régime enrichi en fer héminique (par l'apport d'hémine) par la souris femelle durant la période périnatale, sur la survenue de marqueurs précoces de cancérisation au niveau intestinal chez sa descendance. Des souris exposées au fer héminique au stade adulte uniquement nous permettront de mesurer et comparer les effets observés.

Pour ce faire, différents stades de la carcinogénèse seront étudiés au moyen de 2 modèles de cancer chimio-induits appliqués à la descendance adulte et 1 modèle de carcinogénèse spontanée : (i) un modèle de chimio-induction à l'azoxymethane (AOM). (ii) Un protocole reproduisant l'inflammation de faible intensité qui précède les stades précoces de la carcinogénèse colique sera appliqué par l'ajout de faibles doses de dextran sodium sulfate (DSS) dans l'eau de boisson en complément de l'AOM. (iii) Compte tenu de la fenêtre d'exposition ciblée dans notre projet, un 3ème modèle de carcinogénèse spontanée avec l'initiation *in utero* (souris *ApcMin/+*) apparaît pertinent. La complémentarité des modèles et l'analyse conjointe du microbiote nous permettra de réellement statuer sur le risque associé à la consommation maternelle de fer héminique chez la descendance en comparaison d'une exposition strictement à l'âge adulte et ainsi d'aborder d'un point de vue plus mécanistique les processus conduisant à la pathologie.

Ce projet sur 5 ans, destiné à mesurer l'impact d'un régime alimentaire sur la carcinogénèse à long terme requiert un écosystème colique complet non modélisable par une approche cellulaire. L'utilisation de 376 souris au maximum pour lesquelles les altérations de l'écosystème intestinal potentiellement induites chez la descendance ne sont pas censées conduire à des stades douloureux de la carcinogénèse. L'ensemble de l'expérimentation a été construit dans le respect de la règle des 3R. Ainsi, le nombre d'animaux prévu a été calculé au plus juste selon la convention établie pour les études développementales, à savoir la fourchette basse fixée à 5 portées par groupe, afin de permettre l'obtention de résultats statistiquement fiables et exploitables. Les souris seront logées dans des locaux d'animalerie conventionnelle, dans un environnement contrôlé, calme et enrichi permettant aux femelles gestantes de nidifier sans stress et aux souris de s'abriter dans des maisonnettes en aluminium. Un personnel compétent leur assurera les meilleures conditions possibles de bien-être et de bonne santé tout en limitant au stricte minimum les interventions.

11268 Depuis quelques années, il apparaît de plus en plus évident que le microbiote intestinal joue un rôle important dans l'apparition de nombreuses pathologies digestives parmi lesquelles la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, deux maladies intestinales inflammatoires, mais aussi certains cancers. De plus, certaines bactéries pathogènes sont capables de traverser la barrière intestinale pour provoquer des infections disséminées. Au sein du microbiote intestinal, certains *Escherichia coli* sont fréquemment isolés de patients atteints de maladies intestinales inflammatoires et possèdent des gènes de virulence associés à des souches pathogènes responsables d'infections extra-intestinales graves. Il est important de déterminer le rôle de ces facteurs de virulence dans l'interaction entre les bactéries pathogènes et l'épithélium intestinal pour apporter la preuve de leur implication dans ce type d'infection bactérienne.

Dans un souci de remplacement, des expériences ont été réalisées *in vitro* et ont déjà mis en évidence les effets du facteur de virulence CNF1 sur cellules en culture. Ce projet se propose de définir le rôle de CNF1 *in vivo*. Pour cela, nous utiliserons des souches d'*E. coli* pathogènes pour l'homme exprimant ou non CNF1. Ces souches seront administrées par voie orale chez des souris préalablement traitées à la streptomycine pour éliminer une partie de la flore résidente. Le suivi de cette infection sera effectué après 24h et 48h par mesure de la présence des souches infectantes dans le tube digestif et les selles, ainsi que dans le foie, la rate, les ganglions mésentériques et le sang des animaux. Dans un souci de raffinement et de réduction du nombre d'animaux requis, l'analyse de la littérature nous a permis de connaître la dose de bactéries maximale qui sera utilisée pour l'infection des souris par voie orale, évitant des expériences préliminaires visant à définir la dose infectieuse. Les infections seront réalisées sur des souris BALB/c femelles de 8 semaines et de poids similaires qui auront été acclimatées à leur nouvel environnement pendant une semaine. La procédure de classe légère et le gavage réalisé par des biologistes expérimentés n'entraîneront a priori aucune douleur et aucun signe clinique cependant si des manifestations cliniques pouvant indiquer une souffrance importante (dyspnée, diarrhée, perte de poids supérieure à 20%) étaient observées, les animaux concernés seraient euthanasiés. L'ensemble du projet nécessitera un maximum de 240 souris et une seule procédure de classe légère n'induera pas de douleur chez l'animal pendant le temps court (48h) de l'expérience.

Les tests statistiques ont été choisis avec un biostatisticien. La variable primaire sur laquelle sera appliqué un test statistique est la numération bactérienne, mesurée par unité formant colonie (UFC). Deux facteurs seront considérés : la souche (4 souches) et la cinétique (2 temps). Les différentes souches seront comparées à ces 2 temps. Une analyse de variance one-way ou un test de Kruskal Wallis sera envisageable, afin de réaliser simultanément plusieurs comparaisons entre souches.

11269 Notre projet concerne la mise au point et le développement de la technique d'optogénétique couplée à l'étude du comportement animal, dans le but de l'utiliser dans notre projet de recherche. L'optogénétique est une nouvelle technique permettant, par exemple, de contrôler une activité neuronale grâce à de la lumière. La thématique de notre équipe est basée sur le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la réparation du cerveau lésé, au niveau du cortex moteur (AVC, traumatismes crâniens...). Pour cela, nous développons des neurosphères à partir de cellules souches humaines, afin de les transplanter dans le cortex moteur d'un modèle de souris.

Afin de valider l'intégration du transplant, au sein du cerveau et de manipuler l'activité des neurones transplantés, une approche d'optogénétique, couplée à l'étude du comportement moteur de l'animal, devra être mise en place.

La technique d'optogénétique étant une nouvelle approche au sein du laboratoire, il nous est apparu judicieux de mettre en place cette étude pilote afin de réaliser un apprentissage de la technique chirurgicale, de définir les points limites et le nombre d'animaux nécessaires au futur projet.

Pour cela, des virus non pathogènes exprimant le récepteur qui permet l'activation ou l'inactivation des neurones par un signal lumineux, seront injectés au niveau du cortex moteur de souris sauvages. Un mois plus tard, chaque souris sera transplantée avec une électrode de stimulation par de la lumière et une électrode d'enregistrement. Deux semaines après, les neurones du transplant seront activés ou inactivés et la réponse des neurones enregistrée. Nous souhaiterions

tester deux souches de virus différentes, permettant soit d'activer, soit d'inhiber l'activité neuronale par la lumière.

Un protocole complet nécessite l'utilisation de 30 animaux (soit 15 animaux par souche de virus). La règle des 3R a été prise en considération. De nos jours, il n'est pas encore possible de modéliser un cerveau de mammifère *in vitro*, qui nous permettrait d'étudier les activités neuronales par l'optogénétique et donc de remplacer cette étude par des expériences *in vitro*. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour pouvoir mettre en place cette technique au sein du laboratoire. Enfin, la notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation qui sont optimisées (sédation et analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales.

11270 Les développements récents de l'immunothérapie basée sur la modification des cellules du patient (CAR-T cells) sont en train de révolutionner la prise en charge et le traitement des cancers hématologiques. Il s'agit de modifier/éduquer les cellules immunitaires du patient pour leur permettre de reconnaître et tuer les cellules cancéreuses. Cependant, le coût élevé de ces traitements, la complexité technique de leur mise en œuvre, les effets secondaires observés mais surtout l'efficacité encore limitée dans le temps entraînent un accès restreint à ces nouvelles thérapies.

Nous proposons une alternative plus sûre et plus efficace aux CAR-T conventionnels grâce à l'utilisation de vecteurs encapsulés directement injectés aux patients qui vont stimuler le système immunitaire pour la lutte contre les cellules cancéreuses de ce même patient. Cette innovation permet de s'affranchir de la production *ex vivo* de ces cellules spécifiques, réduisant ainsi de manière drastique le coût des produits thérapeutiques.

Pour mener à bien ce développement, nous devons entreprendre une étude sur l'animal afin de démontrer la sécurité, la spécificité d'action et l'efficacité thérapeutique de cette nouvelle technologie.

Après avoir validé sur des modèles cellulaires qu'il était possible de modifier spécifiquement les cellules immunitaires humaines et murines, nous devons vérifier l'innocuité et le devenir des nanoparticules utilisées dans notre projet. Afin de déterminer si la piste de l'utilisation des lentivecteurs encapsulés pour le traitement de stimulation de l'immunité proche de celui permis par les CAR-T cells, mais sans modification *ex vivo* des cellules du patient est efficace, il est indispensable d'étudier le devenir de ces particules dans un organisme vivant entier. Ceci sera effectué dans un premier temps par étude de la distribution de ces particules dans l'organisme.

La biodistribution d'un composé implique une interaction forte entre les différents compartiments de l'organisme, c'est à dire un échange entre le sang et les organes. Actuellement, il n'est pas possible de modéliser cette répartition tissulaire *in vitro*. Par ailleurs, même si l'innocuité du composé a déjà été estimée *in vitro*, l'effet de l'organisme entier sur le lentivecteur associé à la nanocapsule ne peut être complètement évaluée. Afin de mimer le plus possible les conditions physiopathologiques humaines, nous explorerons la biodistribution et la cinétique de notre composé sur des souris.

Ainsi, nous nous proposons d'injecter les lentivecteurs encapsulés produits dans notre laboratoire et de suivre leur devenir chez la souris. Un marquage spécifique permet de suivre nos nanoparticules au cours du temps, permettant ainsi de réduire de manière importante le nombre d'animaux puisque le produit sera suivi sur 14 jours pour une même souris.

Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à une étude approfondie permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus. Cette étude nécessitera au maximum 49 animaux au total.

De manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire et d'éviter toute forme de souffrance à l'aide de complément alimentaire et de traitement anti-douleur adaptés. Toutes les interventions et administrations se feront sous anesthésie générale ou locale. Des méthodes d'imagerie *in vivo* sous anesthésie générale nous permettront de raffiner nos procédures (biodistribution déterminée de

manière non invasive) ainsi que de réduire le nombre d'animaux (l'animal étant son propre témoin pour certains aspects).

11271 Depuis quelques années, les médecins anesthésistes et les chirurgiens ont observé une meilleure survie des patients opérés de leur cancer ayant reçu une anesthésie loco-régionale en complément de l'anesthésie générale. De façon intéressante, il a été montré que les produits d'anesthésie locale pouvaient induire la mort de cellules cardiaques ou nerveuses. Des premiers travaux *in vitro* laissent supposer que les produits d'anesthésie locale pourraient induire également la mort des cellules cancéreuses. L'objectif de ce projet est de déterminer si ces produits induisent également la mort des cellules cancéreuses dans un organisme vivant (= *in vivo*). En effet, dans un modèle vivant, les médicaments subissent une transformation chimique et biologique qui peuvent modifier leurs propriétés et invalider les effets observés *in vitro*. Par ailleurs, il est également bien connu que les produits d'analgésie interfèrent avec le métabolisme et le système immunitaire. Or, les produits d'anesthésie locale possèdent une propriété analgésique. Les effets attendus *in vivo* pourraient être différents de ceux observés précédemment sur des cellules en boîte de pétri. Par contre, la confirmation *in vivo* d'une induction de mort des cellules cancéreuses apporterait la possibilité d'associer de manière systématique les agents d'anesthésie locale à la chirurgie oncologique et améliorer la survie des patients.

Dans ce projet, l'ensemble des expériences a été conçue afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal.

Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable afin de prouver que les réactions subies par les agents d'anesthésie locale au sein d'un organisme n'altèrent pas leur capacité à induire une réponse anti-tumorale.

Les modalités de mort cellulaire (autophagie, apoptose et stress du reticulum endoplasmique) sont des processus multiparamétriques impliquant des sécrétions humorales et des répercussions immunitaires non modélisables ailleurs que dans un être vivant entier. On ne peut donc se contenter de l'étudier uniquement *in vitro*, il est indispensable d'avoir recours à l'animal de laboratoire. Notre hypothèse est que ces modalités représentent les mécanismes par lesquelles les anesthésiques locaux exercent leur effet anti-tumoral. La compréhension de ce phénomène et sa reproduction *in vivo* ouvrirait la possibilité d'associer systématiquement ces agents au cours des chirurgies oncologiques chez l'homme afin de diminuer le risque de récurrences grâce à la destruction des cellules tumorales résiduelles.

Seul le nombre minimal de souris, calculé mathématiquement, sera utilisé dans l'étude : 786. Les animaux disposent d'un milieu enrichi à l'aide de coton. Les animaux seront observés quotidiennement afin de vérifier leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict (avec échelle d'hétéroévaluation relevant des signes de mal-être tels que : perte de poids, alopecie, agressivité, prostration, agitation, petits yeux, oreilles en arrière.) permettra de vérifier l'absence de mal-être. Des mesures seront prises pour limiter au maximum le stress et la douleur au cours des expériences. Les procédures seront faites sous anesthésie générale ou locale pour les simples injections. Un aliment plus énergétique et appétant sera mis à disposition des animaux au décours des procédures (DietGel haute énergie). Des points limites précoces seront strictement respectés et appliqués.

11272 Le traitement conventionnel du lymphome de Burkitt (LB) repose sur une chimiothérapie intensive de quelques mois (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone). Les taux de guérison sont actuellement de l'ordre de 80-90 % chez les enfants, tous stades confondus. En cas de rechute, si le lymphome reste sensible à la chimiothérapie, des pourcentages de 10 à 20 % de guérison sont obtenus grâce à une thérapie massive mais, s'il existe une chimiorésistance, le pronostic est sombre. Chez l'adulte, le pronostic est d'emblée plus mauvais notamment chez les sujets âgés.

Notre but est de tester un composé qui permettrait d'obtenir des résultats équivalents avec une toxicité moindre. Nous avons déjà montré *in vitro* qu'un nouveau composé (le CHIR99021) permet de réduire 10 fois la dose de doxorubicine nécessaire pour induire la mort de 50% des cellules.

L'avantage de ce composé serait donc, si l'hypothèse se vérifie, de permettre une efficacité anti-tumorale équivalente pour une dose de doxorubicine beaucoup plus faible et donc moins toxique.

Les données déjà rapportées montrent que ce composé a une très faible toxicité chez la souris. Cependant, la cardiotoxicité de la doxorubicine est très documentée. Nos expériences *in vitro* démontrent l'efficacité de la combinaison mais il est indispensable de vérifier son efficacité et son absence de toxicité sur l'organisme entier.

Nous souhaitons donc étudier l'effet de la combinaison CHIR99021 et doxorubicine sur des modèles de souris immunodéficientes greffées avec des modèles de tumeurs dérivées de patients atteints de lymphome de Burkitt.

Nous utiliserons un nombre total maximal de 114 souris. En effet, si la première hypothèse d'un maintien de la mort cellulaire lors de l'utilisation de la combinaison du composé avec la doxorubicine ne se vérifie pas, la dernière procédure d'étude de la croissance tumorale ne sera pas effectuée. Pour évaluer la pertinence de notre étude, nous allons d'abord faire une étude de l'apoptose induite dans les tumeurs en 24h sur un petit nombre de souris. Puis seulement si cela fonctionne, nous réaliserons une étude sur les effets de la combinaison sur la croissance tumorale. Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à une étude statistique permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus. Les techniques de greffe ont été standardisées pour améliorer la reproductibilité des résultats.

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

11273 L'entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN) est une pathologie infectieuse et inflammatoire du tube digestif, focale ou diffuse, atteignant préférentiellement l'intestin grêle distal et le côlon droit sous forme d'ulcération, d'œdème et d'hémorragie sous muqueuse, d'infiltrat inflammatoire, avec parfois des signes ischémiques associés à une nécrose trans-murale de l'intestin. Cette pathologie gastro-intestinale du nouveau-né, souvent liée à une prématurité, nécessite une prise en charge urgente. L'incidence de l'ECUN varie selon les pays et les centres de néonatalogie, variant de 0.3 à 2.4 enfants pour 1000 naissances, avec une morbidité et une mortalité significatives allant de 15% à 30%, mais pouvant atteindre 100% dans les formes les plus sévères avec nécrose complète de l'intestin, perforation digestive et sepsis sévère.

La prise en charge chirurgicale de cette affection peut devenir particulièrement cruciale chez les enfants extrêmement prématurés. En effet, un diagnostic préopératoire précis est parfois difficile à obtenir. Certaines équipes de chirurgie pédiatriques réalisent une cœlioscopie exploratrice à 48h de l'échec du traitement médical. En effet, la laparoscopie est un outil utile dans l'arsenal thérapeutique de la gestion chirurgicale de l'ECUN. Il a été constaté, lors des suivis post exploration cœlioscopique, une baisse plus rapide du syndrome inflammatoire intestinal, ainsi qu'une nette amélioration clinique chez les nourrissons ayant bénéficié de cet examen sans aucun autre geste chirurgical. Cet effet inattendu pourrait être en lien avec l'utilisation du gaz carbonique (CO₂) nécessaire à la cœlioscopie. Si cette hypothèse, en faveur d'une diminution plus rapide de l'inflammation dans l'ECUN après insufflation de CO₂, se confirme cette approche pourrait avoir un réel enjeu thérapeutique dans l'ECUN.

L'objectif principal de notre étude est d'évaluer l'efficacité d'une cœlioscopie précoce chez les nourrissons atteints d'ECUN sans geste chirurgical associé en démontrant son effet anti-inflammatoire intestinal médié par l'insufflation de CO₂ dans un modèle pré-clinique murin de colite au dextran sulfate de sodium (DSS).

La colite induite chimiquement a de nombreuses similitudes sur le plan histopathologique aux lésions d'entérocolite (grandes zones de perte de cryptes épithéliales, infiltration importante de neutrophiles dans la muqueuse, ulcération de la muqueuse intestinale, hémorragie de la muqueuse

intestinale) et permet de se soustraire à l'élaboration de novo d'un modèle d'entérocólite dans le respect de la règle des 3R en réduisant le nombre d'animaux.

Dans l'expérimentation proposée, les souris seront âgées de 5 semaines provenant d'un fournisseur agréé. Après une semaine d'adaptation, le traitement par 1.5% de DSS dans l'eau de boisson sera prolongé pendant une semaine selon les protocoles publiés et couramment utilisés au laboratoire. L'insufflation de CO₂ sera réalisée par l'introduction de cathéters dans la paroi abdominale de la souris sous anesthésie générale et sous contrôle de la pression d'insufflation par l'opérateur. Cette insufflation unique sera réalisée à Jour 4 du traitement DSS pour une évaluation des effets à Jour 7. À jour 7, l'ensemble des souris seront euthanasiées, ou plus précocement si des signes de mauvaise tolérance ou de souffrance avérée des animaux apparaissent lors des évaluations quotidiennes, par un score clinique (point limite). Trois groupes de souris seront envisagés, un groupe « DSS seul », un groupe « DSS + insufflation d'air comprimé », un groupe « DSS + insufflation de CO₂ ». Les effectifs de chaque groupe ont été réduits à 20 souris, soit 60 souris au total pour un temps d'expérimentation d'une année. Nous étudierons alors le retentissement clinique, l'index d'activité de la colite, les données histopathologiques et moléculaires, afin de préciser l'efficacité anti-inflammatoire éventuelle de l'insufflation de CO₂ dans cette situation de colite induite.

Notre approche expérimentale est en adéquation avec la règle des 3R

Remplacer : il est impossible d'évaluer l'effet thérapeutique de l'insufflation de CO₂ sur un modèle *in vitro* ou *in silico*. Aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire la complexité d'une entérocólite, et seul le modèle animal permet de conduire ce projet. La souris est le plus petit animal adapté à ce travail avec une littérature validant ce choix.

Réduire : L'effectif proposé tient compte de la mortalité possible liée à l'induction de la colite, ainsi qu'un éventuel décès post-opératoire de la souris et du fait qu'un effectif plus faible ne permettrait pas de démontrer une différence statistique significative. Dans un but de réduire les effectifs, nous avons jugé inutile d'inclure deux groupes contrôles supplémentaires à cette étude (souris non soumises au DSS et insufflées par l'air ou le CO₂).

Raffiner : Les souris seront opérées sous anesthésie générale multimodale afin d'éviter toute souffrance ou douleur de l'animal. Cette anesthésie consistera en l'inhalation d'isoflurane durant toute l'intervention chirurgicale. Les souris seront surveillées quotidiennement (survie, poids corporel, saignement rectal et consistance des selles) et les mesures nécessaires à la prise en charge de la douleur seront adaptées en fonction de l'état des animaux (analgésie et suivi par l'opérateur des signes de mieux/mal être). Les effets du DSS seront contrôlés quotidiennement par des pesées et une surveillance selon un score standardisé de colite clinique (Score de Cooper). Ce score correspond à une grille d'évaluation clinique (annexe 1) permettant de prendre des mesures progressives (annexe 2) en fonction de l'élévation du score (augmentation de la fréquence des observations, administration de solution saline pour lutter contre la déshydratation, administration d'anesthésiant pouvant être renouvelé toutes les 12h), euthanasie précoce).

Ainsi, le protocole de colite au DSS pourra être atténué voire suspendu en cas de mauvaise tolérance ou de souffrance des animaux : L'environnement des animaux sera enrichi afin de leur permettre d'avoir un comportement le plus naturel possible (cotons, maisons, cycle jour/nuit).

L'expertise du laboratoire dans la colite au DSS permet d'optimiser le suivi des animaux et de mieux apprécier les points limites liés à ce traitement.

11274 On estime qu'il y a plus de 100 000 malades atteints d'insuffisance respiratoire terminale en France, c'est-à-dire chez qui les poumons ne fonctionnent plus correctement (conséquence de fibrose, mucoviscidose, bronchite chronique...) et ne permettent pas de fournir assez d'oxygène à l'organisme. C'est une pathologie impactant fortement la qualité de vie et rapidement mortelle. En dernier recours les patients peuvent bénéficier d'une greffe de poumon. Malheureusement, alors que les résultats de la transplantation sont bons, des personnes continuent de décéder sur liste d'attente de greffe faute de greffons transplantables. Ceci s'explique par la grande fragilité de cet organe, qui s'abîme rapidement chez les donneurs en état de mort encéphalique. De nos jours,

pour pallier la pénurie, les poumons peuvent être perfusés en dehors de l'organisme (perfusion *Ex vivo*) afin d'être évalués, reconditionnés et traités pendant plusieurs heures avant de les greffer à un receveur. Mais même avec cette technique certains greffons se détériorent inexorablement, sont refusés pour la transplantation et sont détruits. Ceci pose le problème éthique de la perte de greffon et donc de chance pour les malades sur liste d'attente ainsi que le problème du coût financier non négligeable de ces procédures qui finalement n'aboutissent pas à une transplantation.

On explique une part de ces échecs par le phénomène dit « d'ischémie-reperfusion » qui correspond à des lésions induites par le manque d'apport de sang et d'oxygène au poumon lorsqu'on le retire de la circulation du donneur, aggravées lorsque le greffon est remis en circulation.

Pour traiter cette pathologie, une piste d'étude est l'utilisation de nano-médicament. Ces molécules utilisent les propriétés spécifiques de particules extrêmement petites (de l'ordre du milliardième de mètre) pour agir sur différentes pathologies (en cancérologie, virologie...). Récemment l'un d'entre eux, le Squalenoyl-Adénosine, a démontré son efficacité à fournir de l'énergie et réduire les effets néfastes de l'ischémie sur des modèles d'accidents vasculaires cérébraux. Notre projet est de tester ce traitement pour limiter le retentissement de l'ischémie des greffons, en espérant ainsi améliorer ses performances lors de la perfusion *ex-vivo* et donc augmenter le pool de greffons utilisables.

Notre protocole prévoit d'utiliser un modèle expérimental porcin. Il n'existe actuellement pas de méthodes alternatives (bancs d'essai, cultures cellulaires, simulation numérique...) permettant de modéliser la perfusion *ex-vivo* et ses effets physiologiques. Pendant la procédure de multiples paramètres physiques et biologiques sont mesurés directement sur les poumons afin de démontrer l'efficacité et l'innocuité du traitement.

Le nombre d'animaux nécessaires pour cette étude a été calculé statistiquement et fixé à 15. Le prélèvement pulmonaire est réalisé sous anesthésie générale au décours de laquelle l'animal sera euthanasié. A aucun moment l'animal n'est conscient ni susceptible de ressentir la douleur.

Pour améliorer le confort et le bien-être des animaux, les animaux sont hébergés dans l'animalerie une semaine avant l'intervention afin de respecter une période d'acclimatation. Ils sont gardés parmi leurs congénères pour réduire leur stress, à raison de deux par enclos. Du personnel animalier professionnel s'occupe d'eux quotidiennement et met à disposition un environnement stimulant (activité de fouissage, distributeur d'aliments, planche à gratter...).

11275 Les leucémies myéloïdes aiguës (LAM) sont une classe hétérogène des leucémies de l'âge adulte. Avec le vieillissement progressif de la population, leur fréquence est destinée à augmenter et elles seront sans doute un problème majeur de santé publique dans les années à venir. Comprendre leur origine et leurs caractéristiques moléculaires sera donc de grande utilité pour une meilleure prise en charge des patients. Comme toutes les hémopathies, les LAM sont la conséquence de nombreuses anomalies génétiques acquises au cours du temps. Ces dernières années, il est apparu que les premières anomalies génétiques responsables de l'apparition des LAM affectent, dans une majorité des cas, des gènes codant des facteurs de transcription nécessaires à l'initiation et la régulation de l'expression d'autres gènes.

Spi1 est un facteur hématopoïétique indispensable au développement des cellules B et myéloïdes et qui doit être peu exprimé pour une érythroïèse et lymphopoïèse T. L'expression anormalement forte de Spi1 entraîne une leucémie érythroïde, en plusieurs étapes, dans un modèle de souris transgénique. Des mutations activantes de Spi1 ont été identifiées chez des patients qui développent des lymphopathies B et des réarrangements de chromosomes associés à des gains de fonctions de Spi1 ont été mis en évidence chez des patients atteints de leucémie aiguë lymphoïde T. Comment Spi1 favorise la survenue des leucémies et quels sont les autres événements moléculaires qui coopèrent avec Spi1 et permettent l'émergence des cellules tumorales reste inconnu. Des mutations de PTPN11/Shp2 (gène) ont été reportées dans la littérature comme favorisant la survenue de leucémies aiguës myéloïdes et de syndromes myélodysplasiques. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont montré que PTPN11 est muté dans les souris TgSpi1 pré-leucémiques et que cette protéine est impliquée avec Spi1 dans l'expansion des cellules pré-leucémiques. Ce projet a pour but de caractériser comment les

mutations de PTPN11 coopèrent avec Spi1 et favorisent l'émergence de cellules pré-leucémiques chez la souris et de tester des inhibiteurs de PTPN11 *in vivo* afin de faire régresser les tumeurs. Le but final est de confirmer le rôle de PTPN11 dans un organisme vivant entier et surtout de déterminer des inhibiteurs potentiellement utilisables chez l'Homme en vue de thérapies.

Ce projet se divise en 3 objectifs : 1) mettre en évidence à quel moment du développement de la pré-leucémie les mutations PTPN11 sont acquises chez les souris TgSpi1 ; 2) montrer que l'expression des mutants PTPN11 dans les cellules souches hématopoïétiques participe avec Spi1 à la transformation leucémique et 3) montrer que l'inhibition de PTPN11 par des inhibiteurs pharmacologiques chez les souris TgSpi1 permet de régresser ou bloquer l'établissement de l'état pré-leucémique induit par Spi1 (procédure 3).

Pour ce projet, il est indispensable d'utiliser des animaux car le projet porte sur l'identification des mécanismes de prédisposition au cancer et sur le suivi du processus de développement tumoral dans l'organisme entier (contexte immunitaire complet). Notre objectif est d'utiliser les souris génétiquement modifiées surexprimant Spi1 pour caractériser les processus et les acteurs de la transformation tumorale (il en faudra 44 pour générer les souris en procédure). Nous mettrons en œuvre une procédure pour l'objectif 1, nécessitant 80 souris, une procédure pour l'objectif 2, nécessitant 100 souris et une procédure pour l'objectif 3, nécessitant 80 souris (nombre total maximal de souris : 304). Les points limite seront strictement appliqués. Toutes les procédures seront faites sous anesthésie à l'isoflurane (prélèvements de sang et injections intrapéritonéales) et sous anesthésie à l'isoflurane et Buprénorphine (certaines ponctions). Les animaux bénéficieront d'un environnement enrichi en tout temps et seront examinés quotidiennement. Du DietGel Energy sera ajouté dans les cages en cas de diminution de la prise alimentaire. Le nombre d'animaux choisi pour chaque lot représente le minimum requis pour constituer un échantillonnage représentatif. Les données obtenues sur chaque animal seront optimisées en analysant simultanément plusieurs organes du même animal ; ce qui est un point de réduction et de raffinement. Dans l'objectif de remplacer l'utilisation d'animaux, nous limiterons le nombre d'animaux utilisés et nous privilégierons toute étude *in vitro* sur des modèles cellulaires établis nous permettant de valider nos hypothèses de travail.

11276 La thérapie cellulaire, basée sur l'utilisation de cellules souches pour régénérer des tissus endommagés, apparaît comme une stratégie très prometteuse pour traiter des maladies neurologiques comme des maladies démyélinisantes pour lesquelles il n'existe pas de traitement à l'heure actuelle.

Nous proposons, dans ce projet, de réaliser des greffes de précurseurs et de cellules souches de type neural de rongeurs et de primates dans un modèle murin de dysmyélinisation (shiverer : Rag2^{-/-}) présentant une invalidation du gène Rag2 et une délétion spontanée du gène codant pour la protéine de la myéline MBP, au cours du développement pour tester leur dynamique de différenciation en oligodendrocytes et potentiel de réparation de la myéline en présence ou non d'une molécule pro-myélinisante. Les effets thérapeutiques des cellules greffées sur la réparation anatomique seront testés en post-mortem par immunohistochimie et microscopie électronique, Western blot et électrophysiologie et portera sur 1702 souris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux. En complément du suivi quotidien réalisé par le personnel de l'animalerie, l'expérimentateur contrôle les animaux de façon quotidienne durant les 5 jours suivant la greffe, puis bihebdomadaire par la suite. En cas de signe manifeste de douleur ou de souffrance avérée (prostration, isolement, perte de poids importante, poil hérissé), nous avons prévu une administration de buprénorphine ; 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de processus biologiques complexes comme la myélinisation et la réparation de lésions de la myéline et les approches thérapeutiques basées sur la thérapie cellulaire. Le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude. Cette

étude devrait contribuer au développement de futures stratégies thérapeutiques applicables à des modèles primates non-humain puis à l'homme et éviter ainsi l'installation de troubles définitifs

11277 La leishmaniose viscérale est une maladie parasitaire en pleine expansion du fait du réchauffement climatique et des mouvements de populations depuis les zones d'endémie. *Leishmania donovani* est un parasite qui affecte uniquement l'homme alors que *Leishmania infantum* affecte l'homme et le chien, ce qui fait du chien un réservoir de parasites pour l'homme. Les médicaments actuels sont toxiques et responsables de chimiorésistance et, de ce fait, la recherche de nouveaux médicaments est urgente. Pour ce faire, dans le cadre de programmes de recherche, nous évaluerons l'activité de substances pures soit d'origine naturelle, soit de synthèse et qui sont des inhibiteurs de voies métaboliques spécifiques au parasite, théoriquement peu ou pas toxiques pour l'hôte parasité. Après un premier criblage de cytotoxicité et d'activité *in vitro* sur le parasite en culture, seules les substances les plus actives et les moins cytotoxiques, c'est à dire présentant un indice de sélectivité acceptable, seront évaluées pour leur capacité à réduire la charge parasitaire sur des modèles de leishmaniose expérimentale chez l'animal. L'objectif étant de découvrir de nouveaux candidats-médicaments contre les leishmanioses humaines et canines, avant de pouvoir accéder aux essais cliniques de phase 1, il est nécessaire de démontrer que les substances sélectionnées *in vitro* sont capables de réduire significativement la charge parasitaire chez des souris infectées en comparaison avec des groupes de souris témoins infectés et traités ou non avec un médicament de référence, la miltefosine. Seul un modèle *in vivo* permet de vérifier la validité du concept. Le modèle *in vivo* est ainsi incontournable car les modèles *in vitro* ne permettent pas de prendre en compte les barrières pharmacologiques rencontrées chez l'animal, ainsi que la métabolisation, auxquelles sont soumises les substances à évaluer. Dans un premier temps, une appréciation de la dose maximale tolérée sera faite sur souris Swiss afin de ne pas traiter des lots d'animaux infectés à des doses toxiques. Les modèles de leishmanioses expérimentales couramment utilisés sont *Leishmania donovani* (parasite d'Afrique et Asie spécifique de l'homme) et *Leishmania infantum* (parasite du bassin méditerranéen commun à l'homme et au chien) chez la souris BALB/c. La souris BALB/c est naturellement sensible à ce type d'infection, ce qui en fait un modèle de choix et reconnu par la communauté scientifique internationale. Ce stade d'évaluation chez l'animal est reconnu comme indispensable avant l'évaluation clinique de phase 1 chez l'homme ou chez le chien, selon que l'objectif est un développement en thérapeutique humaine ou animale. Par ailleurs, nous utilisons le hamster doré comme réservoir de parasites. Ainsi, une rate de hamster infecté permet d'obtenir une quantité homogène de parasites pour l'infection d'au moins 50 souris. L'utilisation du hamster est indispensable pour l'infection des souris, car le pouvoir infectieux des parasites provenant de la rate de hamster est bien supérieur à celui de parasites provenant de cultures. A cela s'ajoute que la multiplication des parasites en culture est faible.

Nous estimons le nombre d'expérimentations annuelles à 8. Ainsi, 2500 animaux seront utilisés sur 5 ans, dont 840 souris Swiss, 60 hamsters dorés, et 1600 souris BALB/c. Les lots de souris infectées seront traités par voie intrapéritonéale dans un premier temps, puis orale ou intraveineuse, selon le cas. Une planification statistique préalable permettra de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'évaluation d'activité antileishmanienne.

Dans le cadre du bien-être des animaux, toute intervention invasive sera précédée d'une anesthésie afin d'éliminer la sensation de douleur. L'état général des souris sera contrôlé quotidiennement et des actions adaptées seront mises en place si nécessaire.

11278 La perte des capacités physiques est une évolution malheureusement inéluctable dans les maladies favorisées par notre mode de vie (alimentation, sédentarité) qui altère le confort de vie des malades et multiplie les nécessités d'hospitalisation ou de prise en charge médicalisée. Les recherches récentes suggèrent que l'inflammation chronique de bas niveau est associée à la diminution de la fonction physique et au risque de sarcopénie, définie comme une perte de masse et de fonction musculaire. Celle-ci est favorisée par un défaut des capacités du muscle à se régénérer. La régénération musculaire peut-être altérée à plusieurs stades du processus (inflammation, réparation, remodelage). L'infiltration des cellules immunitaires (macrophages et lymphocytes T) en

phase précoce du processus est nécessaire aux étapes suivantes. Or, la fonction des cellules immunitaires infiltrées est dépendante de leur métabolisme. Moduler le métabolisme énergétique des cellules T pourrait de ce fait avoir des répercussions sur la réponse inflammatoire liée à un dommage tissulaire et perturber en aval ce qui en dépend. Le projet présenté vise à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces effets. Nous mènerons un protocole expérimental de régénération musculaire, déjà réalisé dans notre laboratoire, et classiquement utilisé comme modèle de régénération musculaire chez la souris. Celui-ci consiste à induire une myonécrose dans le muscle Tibialis Longitudinal Anterior (TLA) par injection de cardiotoxine pour stimuler la régénération du muscle. Nous utiliserons un modèle de souris transgéniques qui présentent un défaut d'expression d'un facteur de transcription impliqué dans le métabolisme des acides gras. Nous utiliserons pour ce projet, des souris (8 par groupe) transgéniques ou non de 2 groupes d'âge (jeunes vs âgées) différents (au total 160 souris). L'analyse portera principalement sur l'effet du génotype caractérisé par un défaut d'expression ou non d'un régulateur du métabolisme spécifiquement dans les cellules T. Secondairement, l'analyse portera sur l'effet de l'âge sur cette réponse.

Pour satisfaire aux 3R :

- Réduction : nous utiliserons le muscle de la patte non blessée comme contrôle (injection de solution saline). Les souris mâles et femelles seront utilisées.

-Remplacement : Nous ne pouvons pas effectuer de remplacement pour ce projet puisque le système immunitaire est un système intégré et complexe qui ne peut être reproduit *in vitro*.

-Raffinement : Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape de l'expérimentation. L'injection intra-musculaire de cardiotoxine sera réalisée sous anesthésie gazeuse (inhalation de vetflurane). Pour réduire la douleur induite par l'injection de Cardiotoxine, nous utiliserons la buprénorphine comme analgésique par administration en sous-cutané (20 minutes avant l'anesthésie). Selon le temps nécessaire pour retrouver un déplacement normal (24 à 48h) et les signes de douleur ou d'inconfort, nous répèterons l'injection toutes les 12h. Nous mettrons dans le bas de la cage, de l'eau gélifiée et la nourriture afin de ne pas limiter la prise alimentaire en raison d'une moindre capacité des animaux à se déplacer. Afin de détecter au plus tôt tout signe de souffrance et d'y remédier, nous apporterons une attention particulière à chacun des animaux lors des 2 premiers jours suivant l'injection : les animaux seront observés et le poids des animaux et la prise alimentaire seront mesurés. Dans 99% des cas, les animaux récupèrent très vite après l'injection mais si l'état se dégradait pour l'un d'entre eux, l'animal serait immédiatement euthanasié par dislocation cervicale.

11279 Les psychostimulants s'adressent aux patients atteints de troubles du sommeil tels que la narcolepsie, maladie caractérisée par une somnolence excessive diurne et des attaques de cataplexie. Ces médicaments sont également utilisés par les travailleurs postés et envisager dans le traitement du syndrome d'apnée obstructive du sommeil en complément d'appareillages respiratoires portés la nuit afin de traiter la somnolence excessive diurne.

Le modafinil est un psychostimulant non-amphétaminique dont le mécanisme d'action est complexe et implique de nombreux systèmes neuronaux. Il a cependant été récemment décrit comme agissant sur de nouvelles cibles localisées dans les cellules non-neuronales. Le but de ce projet est de caractériser le profil pharmacologique du modafinil dans un modèle de souris déficiente de cette cible pour mieux comprendre le mécanisme par lequel l'activité éveillante du psychostimulant est potentialisée afin (i) d'améliorer son efficacité et (ii) de développer de nouvelles molécules.

Dans cette optique, les électroencéphalogrammes (EEG) de ces animaux seront enregistrés après traitement afin de pouvoir quantifier les durées des différents états de vigilance (éveil, sommeil lent et sommeil paradoxal). Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués, des analyses immunohistochimiques ainsi qu'une caractérisation moléculaire et biochimique seront réalisées. Au total, 124 souris seront utilisées. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisé, le design des expériences comportementales et des expériences de physiologie a été calculé au plus juste, en tenant compte de la puissance des analyses statistiques. Dans la mesure du possible, le

remplacement des animaux par des méthodes alternatives (modèles mathématiques, méthodes *in vitro* ...) est préféré. Toutefois, vu la nature de nos recherches, l'utilisation de rongeurs reste nécessaire. Enfin, le raffinement des méthodes expérimentales visant à réduire à son maximum la souffrance animale est mise en œuvre grâce à l'utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques appropriés lors de chirurgies, à la mise en place de soins post-opératoires et de points limites clairement établis. Les expériences seront menées par des personnels hautement qualifiés dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur.

11280 La cécité nocturne congénitale stationnaire (CNCS) est un groupe de pathologies rétiniennes cliniquement et génétiquement hétérogène. La plupart des personnes atteintes ont une acuité visuelle basse, associée à des difficultés d'orientation en condition de faible luminosité. De nombreux patients présentent également d'autres anomalies oculaires telles qu'une forte myopie (< -6 dioptries), un strabisme ou un nystagmus. Parmi les différentes formes de CNCS, la forme complète, CNCS_c, se caractérise par un dysfonctionnement de la transmission du signal entre les photorécepteurs et une classe de cellules bipolaires. L'électrorétinogramme (ERG) de ces patients montre que la réponse des photorécepteurs à bâtonnet (onde b) est significativement diminuée. Aucun traitement n'est actuellement disponible.

Dans des études antérieures, il a identifié que différents gènes étaient impliqués dans ce défaut de transmission dont les gènes GRM6 et LRIT3, qui nous intéressent plus particulièrement dans cette étude.

Dans ce projet, nous tenterons d'apporter une solution thérapeutique à cette pathologie grâce à l'apport d'un gène sain afin de remplacer le gène défectueux. Nous injecterons le gène Grm6 ou Lrit3 à l'aide d'outils viraux à des animaux qui en sont déficients ainsi qu'à leurs apparentés sains. Trois constructions différentes et une construction contrôle par gène seront testées et à 3 âges différents (2 jours, 15 jours et 1 mois). Au total 1256 souris seront impliquées dans ce projet (y compris les témoins).

La restauration d'un phénotype normal sera évaluée par des électrorétinogrammes, des images de la rétine et des tests d'évaluation de l'acuité visuelle. Les animaux seront ensuite euthanasiés et les yeux récupérés pour études histologiques complémentaires.

En respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R », 1) remplacement : Etant donné qu'il n'est possible de reproduire un modèle de cécité nocturne *in vitro*, nos études nécessitent l'utilisation d'un modèle animal.

2) réduction : le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre objectif scientifique du projet. 3) raffinement : Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Les animaux seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les animaux bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse). Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien-être.

11281 L'initiation du cancer est considérée être un événement rare qui résulte de la mutation de cellules individuelles dites « fondatrices », dont la prolifération incontrôlée crée la tumeur. Cependant la plupart des études actuelles du cancer n'étudient pas cette étape initiale mais sont conduites sur des tumeurs comprenant de nombreuses cellules à partir desquelles l'évolution de la tumeur est déduite. Ces approches ne permettent pas de résoudre deux questions fondamentales de la cancérogénèse :

1) Quelle est l'efficacité des mutations à l'origine des cancers ? En d'autres termes, quelle est la probabilité qu'une cellule mutante donne naissance à une tumeur ?

2) Pourquoi certaines cellules mutantes développent une tumeur et d'autres non ? Quel est le rôle de l'environnement de la cellule dans cette initiation ?

La réponse à ces questions nécessite une étude du destin de cellules individuelles mutantes et de leurs descendantes qui est le but du présent projet. Pour cela nous proposons d'utiliser une

méthode originale développée dans l'équipe pour induire dans des cellules choisies d'un organisme vivant (le poisson zèbre ou *Danio rerio*) des mutations connues pour être à l'origine de nombreux cancers. Notre méthode utilise la lumière que l'on focalise à l'aide d'un microscope sur des cellules isolées afin d'y activer l'expression de gènes porteurs de mutations dites oncogéniques (qui sont à l'origine de cancers).

Nous utilisons *Danio rerio* comme modèle expérimental car c'est un organisme transparent (donc accessible à la microscopie et à la photo-activation), qui pond des centaines d'œufs et dans lequel il est relativement facile d'introduire par transgénèse des gènes photo-inductibles porteurs de mutations oncogéniques.

Notre étude nous permettra de mesurer la probabilité de développement d'une tumeur à partir d'une seule cellule mutante dans différentes conditions, dans différents tissus en présence ou non d'agents chimiques cancérigènes ou de médicaments anti-tumoraux. En étudiant la réponse cellulaire (génétique et protéique) à la photo-induction d'une mutation oncogénique nous espérons comprendre pourquoi certaines cellules mutantes développent un cancer alors que d'autres non.

La compréhension de ces stades initiaux de la cancérogénèse devrait nous permettre de développer et tester des médicaments ciblant spécifiquement cette étape critique du cancer. Bien qu'un tel développement soit hors de portée pour notre laboratoire il pourrait être poursuivi par des laboratoires industriels locaux intéressés par la cancérogénèse.

La larve de *Danio rerio* est le seul modèle vertébré qui nous permet de répondre aux questions scientifiques du projet, en utilisant *in vivo* des techniques entièrement non-invasives. Les statistiques seront réalisées sur le nombre de cellules photo-stimulées par animal permettant le développement de tumeurs, et sur le nombre d'animaux par condition qui auront développé des cancers. Les analyses génomiques post mortem porteront sur des échantillons tumoraux issus de plusieurs animaux par condition. Ainsi, pour étudier l'effet *in vivo* de 3 oncogènes, 300 animaux par oncogène et par année seront nécessaires pour analyser l'effet de différents contextes génétique et environnementaux seuls ou combinés (sauvage, p53^{-/-}, immuno-déficiences génétiques, immuno-déficiences induites, molécule cancérigène) sur le développement tumoral, à raison de 30 animaux par condition. Pour chaque lignée transgénique exprimant chaque oncogène, 250 couples fondateurs seront nécessaires. Le projet étant dimensionné pour 5 années, le nombre total d'animaux est estimé à 5000 (3 x 300 x 5 + 500).

Afin de respecter le bien-être des animaux les manipulations aux stades larvaires et adultes se feront sous anesthésique. Les animaux seront suivis individuellement, mais élevés en groupe afin de respecter leur instinct grégaire. Une surveillance quotidienne de leur comportement permettra de prévenir des états de souffrance (mobilité, nage erratique, prostration, isolement, etc.). Les animaux développant des tumeurs seront euthanasiés suivant le protocole adapté afin de procéder aux analyses génomiques et protéiques post mortem.

11282 Le cancer du sein métastatique est la cause majeure de mortalité chez les femmes. Les métastases cérébrales sont les localisations les plus graves : les agents thérapeutiques ciblant les cancers du sein atteignent difficilement le cerveau protégé par sa barrière « hémato-encéphalique » ou, s'ils l'atteignent, n'y sont pas suffisamment concentrés. Les métastases cérébrales sont particulièrement fréquentes dans deux types histologiques de cancers du sein : les cancers du sein dits triples négatifs et les cancers du sein sur-exprimant la protéine HER2. HER2 (human epidermal growth factor 2) est un récepteur membranaire qui ; s'il est exprimé à la surface des cellules cancéreuses ; représente un facteur de mauvais pronostic. Les métastases cérébrales sont responsables du décès de 50% des patients ayant un cancer du sein HER2.

Le trastuzumab est un traitement de référence pour la prise en charge des cancers du sein HER2. Cependant, bien que ce traitement permette de réduire la progression tumorale dans 80 % des cas pour des métastases situées en dehors du système nerveux central, cet agent thérapeutique ne peut pas passer la barrière hémato-encéphalique suffisamment rapidement afin d'atteindre des concentrations suffisantes afin d'induire une régression tumorale des métastases cérébrales.

L'administration de molécules thérapeutiques directement dans le liquide céphalorachidien, qui protège le cerveau, (administration intrathécale) a été développée pour pallier cette incapacité des agents à passer la barrière hémato-encéphalique. Plusieurs rapports montrent par exemple, que l'injection intrathécale de trastuzumab a un effet bénéfique dans le traitement des métastases des cancers du sein HER2. Cependant, nous avons aussi mis en évidence une élimination rapide du trastuzumab du cerveau, due notamment à l'une des briques protéiques qui compose la barrière hémato-encéphalique (fragment Fc).

Notre projet consiste donc à développer un nouvel agent thérapeutique, dérivé du trastuzumab dépourvu du fragment Fc (fragment Fab). L'objectif de l'expérimentation proposée doit permettre de valider que le nouvel agent thérapeutique dépourvu de partie Fc est éliminé moins rapidement du cerveau que le trastuzumab. Pour cela, une comparaison entre la cinétique du Trastuzumab et du nouvel agent thérapeutique sera réalisée sur des rats. Afin de valider ces résultats deux composés thérapeutiques de référence (le bevacizumab et le ranabizumab) seront testés en parallèle afin de valider les expérimentations. Un cathéter intrathécal sera posé chez des rats pour tester ces 4 composés thérapeutiques (236 au total). Les molécules thérapeutiques seront injectées dans le liquide céphalo rachidien (LCR) par ce cathéter, puis une ponction de LCR sera réalisée afin de mesurer la concentration de médicament au niveau cérébral à différents temps de cinétiques (10 temps au total) et apporter la preuve du concept proposé. Un dosage plasmatique des molécules thérapeutiques injectées sera également réalisé pour chaque temps de cinétique.

Cette expérimentation répond néanmoins aux exigences en termes de réduction, de remplacement et de raffinement. En effet, une étude systématique de l'ensemble des organes en tissu fixé (histologie, immunohistochimie), congélation (extraction d'acides nucléiques et protéiques) et microscopie électronique permet de réduire le nombre d'animaux étudiés. Bien qu'existent des modèles *in vitro* de barrière hémato-encéphalique, que nous utiliserons d'ailleurs dans le cadre de ce projet, l'utilisation des animaux reste indispensable pour les tests pharmacologiques avant le transfert à l'homme. En effet, notre projet a des ambitions de transfert au patient, en recherche clinique, dès lors que nous aurons fait la preuve du concept de l'efficacité du fragment Fab dans le traitement des métastases cérébrales du cancer du sein HER2.

Tout sera fait pour favoriser le bien-être des animaux pendant l'élevage, mais aussi et surtout pendant les actes chirurgicaux (pose de cathéter, prélèvement de LCR) ou les animaux seront anesthésiés pour limiter stress et douleur. Tout animal qui atteindrait un point limite avant la fin de l'expérimentation sera euthanasié suivant une méthode réglementaire.

11283 Depuis ces dernières années, l'incidence des cancers augmente de par le monde. Avec l'avancé des traitements, la survie des patients s'est améliorée. Toutefois, la maladie métastatique reste un problème majeur et implique une morbidité et une mortalité importante. Leur traitement est rendu d'autant plus difficile que ces métastases ont tendance à résister aux traitements conventionnels.

Les xénogreffes de tumeurs de patients consistent à greffer un fragment de la tumeur chez la souris pour qu'elle s'amplifie. Il s'agit d'un acte chirurgical superficiel puisque les fragments sont implantés en sous cutané au niveau du dos sous anesthésie générale. Les xénogreffes constituent de formidables modèles d'étude de la pathologie humaine dans la mesure où elles reproduisent les caractères de la tumeur dont elles sont issues, dans la diversité cellulaire et la complexité des structures. Actuellement il n'existe pas de techniques alternatives qui reproduisent aussi fidèlement le comportement des tumeurs humaines.

Puisque ces xénogreffes reproduisent la pathologie dont elles sont issues, elles constituent des outils de choix dans l'étude des mécanismes de résistances des tumeurs aux drogues. Etudier ces mécanismes à 2 enjeux : 1) Apporter un traitement personnalisé au patient. En testant de nouvelles combinaisons thérapeutiques, notre objectif est de trouver les molécules les plus efficaces pour traiter le patient dont est issue la xénogreffe et ainsi maintenir un schéma thérapeutique efficace en limitant la survenue de résistances. 2) Développer de nouvelles méthodes thérapeutiques. Les xénogreffes de tumeurs humaines étant des reflets pertinents de la pathologie humaine, nous

développons de nouveaux agents thérapeutiques en collaboration avec des équipes de chimistes et physiciens que nous testons sur nos modèles.

Pour ce projet, 3 850 souris NMRI-nude seront nécessaires. Une grande partie de ces animaux est destinée à l'entretien des lignées tumorales humaines tout au long des 5 ans. En effet, pour entretenir les modèles de xénogreffes, un minimum de 4 souris est nécessaire. Lorsque les points limites sont atteints, une partie de la tumeur est greffée à 4 autres animaux. Compte tenu du fait qu'il faille en moyenne un mois et demi pour atteindre ces points limites ; et compte tenu du nombre de lignées de xénogreffes, 670 animaux sont nécessaires par an. 500 de ces animaux seront par ailleurs utilisés pour tester de nouveaux schémas et agents thérapeutiques. Actuellement il n'existe pas de solution de remplacement de ces modèles pour tester des agents thérapeutiques sur des tumeurs de patients, en conservant au maximum les caractéristiques du cancer humain. Par ailleurs le nombre d'animaux nécessaire a été calculé au minimum pour nous permettre d'atteindre les objectifs fixés. Un nombre de 4 souris par passage tumoral est un minimum pour ne pas mettre en danger la pérennité des lignées de xénogreffes. Des groupes de 10 animaux traités permettront d'avoir une puissance statistique suffisante (test de Mann withney). Concernant le raffinement, les actes de greffe sont réalisés sous anesthésie générale avec analgésie. Un suivi quotidien des animaux est assuré par les membres de l'animalerie et le personnel formé de l'unité. Pour assurer le bien-être des animaux, les souris sont placées en groupes sociaux et dans des cages avec enrichissement. Bien que ni la croissance des tumeurs, ni le traitement des souris ne présente de risques majeurs, des points limites précoces ont été fixés pour limiter la gêne et la souffrance éventuelle des souris.

Enfin, nous avons pour volonté de recueillir le maximum d'informations de nos modèles pour que chaque animal soit le mieux utilisé possible. Aussi, une dissection systématique est opérée pour tous les animaux. Un maximum d'organe est récupéré dans diverses conditions de fixation, constituant ainsi des banques de tissus qui pourront être utilisées pour des analyses cellulaires, immuno-histochimiques ou moléculaires.

11284 Les neurones qui libèrent la dopamine (DA) dans le cerveau jouent un rôle important dans les processus impliquant les mouvements volontaires, la prise de décision et l'apprentissage. Ces neurones essentiellement localisés un petit noyau dans le tronc cérébral communiquent avec les neurones de multiples régions distantes dans le cerveau. Cependant les propriétés des connections individuelles sont mal connues et comment les neurones à dopamine combinent toutes ces informations reste encore à être élucidé. Parmi ces connections, le glutamate est un des acteurs chimiques principaux de cette communication interneuronale. Il exerce une action excitatrice par sa liaison à des récepteurs spécifiques présents à la surface des neurones à DA. Dans ce projet, nous visons à caractériser les propriétés des connections excitatrices sur les neurones à DA et la nature des récepteurs au glutamate mise en jeu.

Afin de stimuler une connexion et pas les autres, nous exprimerons dans une région donnée du cerveau la channelrhodopsin, une molécule codée génétiquement induisant une excitation neuronale en réponse à une stimulation lumineuse. Ainsi nous induirons la libération de glutamate au voisinage des neurones à DA par photostimulation des fibres nerveuses exprimant la channelrhodopsine. L'effet de la fixation du glutamate et l'identification des récepteurs impliqués seront réalisés par électrophysiologie et pharmacologie.

Il n'est pas possible de réaliser ces expériences sur des cellules en culture car il est nécessaire de conserver la connectivité avec les neurones voisins et distants. De plus les neurones à DA sont peu nombreux dans le cerveau et ne peuvent pas être mis en culture. Ce projet utilisera des souris génétiquement modifiées exprimant la Cre recombinase spécifiquement dans certains neurones glutamatergiques. L'expression locale et ciblée de channelrhodopsin permettant conduira à affiner les connaissances sur les propriétés synaptiques entre des régions lointaines du cerveau avec les neurones DA.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet seront nés et élevés en captivité. Leur nombre a été réduit au maximum (500 souris) afin d'obtenir des données suffisantes pour répondre aux exigences statistiques des questions scientifiques posées. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des

échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêts permettront de veiller au bien-être des animaux et un environnement enrichi sera fourni aux animaux (nid végétal).

11285 Les conséquences d'un stress prénatal ne sont aujourd'hui pas interprétées de façon consensuelles comme étant négatives ou adaptatives pour la descendance. Cette étude est réalisée dans le but d'évaluer si un stress social prénatal pourrait avoir des effets sur a) les traits de personnalité ; b) sur le comportement individuel et collectif de transport de matière dans la construction du nid et c) sur les compétences cognitives de la descendance.

Pour cela nous allons mettre en couple des individus qui formeront par défaut la génération F0. Les femelles de la moitié de ces couples seront stressées par confrontation sociale (intrusion dans la cage d'un couple stable) une fois gestantes formant ainsi les groupes expérimentaux "stressé" et "contrôle". Ces femelles donneront naissance à la génération F1 stressée de façon prénatale ou non.

Dans une première partie nous allons mesurer les traits de personnalité chez la génération F0 et F1 grâce à des tests classiquement utilisés (test d'Open field, test du nouvel objet, test de labyrinthe en croix sur élevée) se basant sur les profils comportementaux des individus au cours d'un test de vocalisation de séparation et d'un test de transport. Les traits de personnalité étant définis comme des différences comportementales individuelles stables dans le temps, ces mesures sont répétées, catégorisées et interprétées comme des mesures reflétant la néophobie, l'exploration, la hardiesse, l'anxiété par exemple. En plus de ces tests, les vocalisations ultrasonores des juvéniles (pendant une courte séparation de la mère) directement représentatives d'un trait de tempérament vont être enregistrées et analysées.

Dans un deuxième temps nous allons mélanger entre elles la moitié des portées de la génération F1 des deux groupes expérimentaux puis nous allons évaluer les performances de transport des individus dans les différentes conditions (avec ou sans stress prénatal, en fratrie intacte ou mélangée). La souris glaneuse est une espèce très particulière chez laquelle on observe une division du travail lors de la construction collective du tumulus (nid très complexe) par le transport de matière. Certaines étapes de cette construction peuvent être reproduites en conditions de laboratoire grâce à des boules de cotons remplaçant les matières végétales qu'elles transportent dans leur milieu naturel, soit uniquement par la fratrie ("fratrie intacte", voir ci-dessus) soit en collaboration entre plusieurs fratries ("fratries mélangés", voir ci-dessus). Grâce à un système de puces RFID (Radio Frequency Identification Device) implantées dans les boules de cotons et sur les souris nous pourrions mesurer les performances de chaque individu.

Dans un troisième temps nous évalueront les effets d'un stress social prénatal sur les performances cognitives sur la générations F1 dans les deux groupes expérimentaux grâce à un test de biais cognitif.

- Réduire le nombre d'animaux en expérimentation : l'étude porte sur 352 animaux dont 40 couples expérimentaux (=80 individus adultes, génération F0) qui produiront 40 portées de 6 individus chacun (= 240 petits, génération F1) plus 16 couples résidents (= 32 adultes, qui seront utilisés pour stresser les femelles gestantes de la génération F0 par confrontation sociale). Ce nombre est nécessaire afin d'obtenir un échantillon suffisamment important d'animaux (provenant de différentes portées) dans les différents sous-groupes. Ceci dans le but de tester statistiquement notre question d'intérêt, compte tenu du caractère multidimensionnel de notre projet.

- Raffiner la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites. Il s'agit d'expériences sur le comportement n'entraînant pas de stress supérieur à ceux pouvant être rencontré dans leur milieu naturel lors des courantes confrontations sociales. En ce qui concerne les autres tests, il s'agit de tests sur le comportement n'entraînant pas de stress majeur pour les animaux. La pose des transpondeurs est une pratique de marquage courante sur les animaux domestiques et a déjà été validée pour l'espèce étudiée. Le maintien en fratrie ne pose aucun problème pour cette espèce et correspond à la structure sociale en milieu naturel.

- Remplacer les modèles animaux. Le modèle animal, en l'occurrence la souris glaneuse, est l'objet d'étude et ne peut donc être remplacé. Les connaissances acquises sur cette espèce peuvent contribuer à améliorer les gestions des espaces agricoles où vit la souris glaneuse.

11286 L'utilisation des cellules souches hématopoïétiques (CSHs) en médecine suscite un fort intérêt du fait de leur potentiel thérapeutique à long-terme pour certaines maladies hématologiques innées et acquises. Lorsque les CSHs, obtenues à partir des cellules de la moelle ou du sang mobilisé d'un donneur sain, sont transplantées à un patient dans le cadre d'une greffe allogénique (d'un individu à un autre), elles remplacent efficacement l'ensemble des cellules sanguines du patient. A défaut de donneur compatible, les CSHs du patient (obtenues de la même manière) peuvent être génétiquement modifiées ex-vivo et lui être transplantées. On parle de thérapie génique et de greffe autologue. Cependant, l'utilisation des CSHs autologues en thérapie cellulaire et génique est confrontée aux difficultés suivantes : i) obtenir les CSHs du patient en quantité suffisamment importante pour ne pas compromettre leur survie à court-terme une fois transplantées, ii) ne pas altérer leurs propriétés biologiques durant le processus de transduction (phase durant laquelle les cellules sont cultivées ex-vivo et qui est nécessaire à l'introduction du « gène médicament ») et ne pas altérer les chances de guérison.

La moelle osseuse et le sang mobilisé sont les sources préférentielles de CSHs. Le sang de cordon est une autre source de CSHs mais son utilisation est encore plus complexe du fait de la quantité encore plus faible de CSHs, quantité ne permettant pas de reconstituer le système hématopoïétique d'un individu dans des conditions optimales de sécurité.

Dans le but d'augmenter le nombre des CSHs, quelle que soit leur origine, nous nous attachons à optimiser les méthodes d'expansion et de modification des CSHs. Nous recherchons donc des molécules capables d'augmenter le potentiel thérapeutique de ces cellules. Nous travaillons également sur les processus de transfert de gènes dans le but de modifier plus efficacement les CSHs. L'objectif est d'optimiser les protocoles de transplantation des CSHs autologues dans le cadre des procédures de thérapie cellulaire et de thérapie génique.

L'effet de différentes molécules et/ou cocktail de molécules ainsi que des protocoles de transduction sont évalués dans des systèmes de culture *in vitro* mais ces systèmes de culture ne permettent pas d'évaluer la capacité des CSHs à reconstituer le système sanguin à long-terme. C'est la raison pour laquelle le recours à l'animal est nécessaire. Pour ce faire, nous devons injecter les CSHs génétiquement modifiées et/ou amplifiées à des souris et étudier la reconstitution hématopoïétique des cellules humaines dans le sang et la moelle des animaux. Comme chez les patients, les CSHs génétiquement modifiées seront greffées aux souris ayant préalablement subi un conditionnement (ici irradiation) pour permettre la prise de greffe. Les animaux utilisés dans cette étude doivent être immunodéficients pour tolérer le développement de cellules humaines (greffe). Ils ont été élevés à des fins scientifiques dans des établissements agréés. Dans le cadre de ce projet de 5 ans qui permettra de tester plusieurs dizaines de molécules en parallèle, des dizaines de conditions de cultures différentes et des protocoles différents de modification des CSHs, le nombre maximum d'animaux est de 4140. Ce nombre a été déterminé grâce aux données de la littérature et à notre expérience, et réduit au minimum nécessaire tout en garantissant la fiabilité des résultats. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par le vétérinaire. Le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un environnement enrichi permet de veiller au bien-être des animaux. Par ailleurs, les équipes mettront en œuvre les protocoles thérapeutiques nécessaires et des critères d'arrêt des expériences sont définis par le vétérinaire du centre en cas de signes inattendus de douleur et/ou de stress.

11287 Ce projet vise à étudier les fonctions neurodéveloppementales d'une protéine d'intérêt en réprimant ou en induisant son expression dans les populations neuronales et gliales lors de leur mise en place dans le cortex murin. L'absence de cette protéine chez la souris se traduisant par des altérations comportementales, nous souhaitons étudier son rôle au cours des processus de neurogenèse, migration et positionnement des neurones. Les mécanismes régulant la mise en place des différents types cellulaires (neurone, glie) au cours de la corticogenèse sont particulièrement complexes, et

impliquent différents modes de communication tels que des interactions cellule/cellule, la production de facteurs diffusibles, etc... Il n'existe actuellement aucun modèle in vitro permettant de reproduire l'ensemble de ces phénomènes et donc d'analyser le rôle de la protéine étudiée dans notre équipe dans ce contexte. La technique employée est l'électroporation in utero, réalisée par injection de plasmides dans les ventricules cérébraux des embryons, suivie d'une électroporation de manière à assurer l'entrée du vecteur dans les cellules ciblées. L'approche est menée suite à une laparotomie pratiquée sur des souris gestantes sous anesthésie et analgésie. Les avantages majeurs de cette approche sont de pouvoir étudier le phénotype de cellules modifiées dans un environnement physiologique, et de pouvoir associer les bénéfices de l'utilisation des vecteurs plasmidiques (souplesse, adaptabilité, rapidité de production) à ceux des modèles transgéniques murins.

Les animaux utilisés seront des souris femelles adultes aux 14 et 18èmes jours de gestation. Ces souris seront soit des animaux C57Bl/6, soit issus d'une lignée hébergée au laboratoire et dont le gène codant la protéine étudiée est floxé, afin d'en obtenir l'invalidation par apport exogène d'une recombinaison Cre. Plusieurs conditions expérimentales seront étudiées, par l'injection de différents vecteurs (contrôle ; surexpression du gène d'intérêt ; invalidation constitutive du gène d'intérêt ; invalidation inductible du gène d'intérêt) et analysées à différents temps (24-72h post-transfection). Le nombre total de femelles gestantes nécessaires à l'obtention des échantillons est de 72, en tenant compte de la variabilité du nombre d'embryons par portée et du risque de pertes d'embryons inhérent à la technique, ainsi que 360 embryons (5 en moyenne par portée dans cette lignée), soit 432 animaux au total. Les groupes expérimentaux ont été formés de manière à réaliser les différentes analyses sur les mêmes portées, ceci afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Afin de réduire l'inconfort ou l'angoisse des animaux, ces derniers seront hébergés en milieu enrichi, en veillant à utiliser des groupes homogènes sans surpopulation au sein des cages. Les procédures seront réalisées sous anesthésie et une analgésie pré/per/postopératoire sera mise en place. Au cours des heures suivant l'acte chirurgical, les souris sont soumises à une surveillance particulière afin de déceler tout signe de souffrance (notion de points limites).

11288 Les complications cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans les pathologies métaboliques qui regroupent l'obésité, le syndrome métabolique ou le diabète de type 2 (DT2). Les données cliniques montrent que 75% des patients diabétiques, décèdent suite à des complications cardiaques. Il est également connu que ce risque est augmenté chez les femmes et les fumeurs. De nombreux indices suggèrent un rôle déterminant de la dérégulation fonctionnelle de la perfusion myocardique dans le développement des atteintes cardiaques non-coronariennes comme les cardiomyopathies non-ischémiques conduisant à une insuffisance cardiaque. Toutefois, par manque d'outils d'évaluation directe et quantitative de la perfusion tissulaire aux niveaux structurel et fonctionnel en conditions physiologiques, la nature exacte de cette relation n'est toujours pas clairement déterminée. La résolution des mécanismes sous-jacents correspondants est pourtant d'un enjeu majeur pour le développement de stratégies thérapeutiques et préventives efficaces. En effet, la prévalence croissante de l'insuffisance cardiaque avec plus d'un tiers des patients insuffisants cardiaques diabétiques- appelle à des actions urgentes. Dans ce contexte, l'étude de modèles animaux est déterminante. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique fiable pour évaluer la fonction cardiaque en conditions physiologiques et les avancées technologiques récentes rendent aujourd'hui possible l'exploration de la perfusion tissulaire du myocarde de manière quantitative sans injection d'agent de contraste ; offrant une alternative strictement non-invasive aux méthodes actuelles.

Ce projet se divisera en 4 phases et cela pour une durée de 5 ans :

1) Développement et validation de nouvelles méthodes d'IRM cardiaque pour l'analyse dynamique de la perfusion myocardique sans injection d'agent de contraste chez les modèles murins (rats et souris).

2) Mise au point et optimisation de protocoles de stress cardiaque pharmacologique (adénosine et régadénoson) et développement d'un test de stress cardiaque physiologique par l'activité musculaire (électrostimulation transcutanée).

3) Suivi longitudinal de la perfusion myocardique au cours de la progression du diabète de type dans des modèles de souris et de rats obèses du fait de l'inactivation de la production de leptine et/ou de son récepteur (animaux hyperphagiques).

4) Développement d'une étude pour l'évaluation de l'effet synergique de la nicotine sur la dégradation de la fonction du cœur diabétique afin d'appréhender les risques des thérapies de remplacement et/ou des cigarettes électroniques dans cette population clinique.

Notre travail méthodologique rendra possible et pour la première fois, l'évaluation longitudinale de la fonction de perfusion myocardique en conditions physiologiques au niveau structurel (vasodilatation maximale sous stress pharmacologique) et fonctionnel (ajustement du débit sanguin coronaire à la demande métabolique du myocarde augmentée par l'activité musculaire). Au-delà des informations fondamentales physiologiques inédites, ces données permettront d'établir une fenêtre optimale pour la mesure de la réserve de perfusion pour chacun des différents stress cardiaques. Cette standardisation participera à réduire la variabilité des paramètres physiologiques mesurés et donc le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des puissances statistiques suffisantes (tests non paramétriques) pour chaque étude.

L'ensemble de ce travail sera réalisé sur des animaux sains (134 rats et 172 souris) pour permettre une l'application optimale de nos protocoles aux modèles pathologiques.

Pour compléter la partie applicative de ce projet sur les deux modèles rats et souris, 205 animaux diabétiques (rats -souris) et 184 contrôles sains (rats souris) ainsi que 188 animaux obèses (rats souris) seront explorés. L'ensemble de ces études, (à l'exception de l'étude pilote sur l'effet de la prose chronique de nicotine sur la fonction myocardique du cœur diabétique) seront conduites chez des animaux des deux sexes pour mieux comprendre la plus grande prévalence des complications cardiaques chez les femmes diabétiques par rapport à leurs homologues masculins. Toutes les procédures seront effectuées sous anesthésie (isoflurane 1.5-2.0%).

Un autre objectif de ce travail est de rendre accessible, en routine, nos nouvelles méthodes IRM afin de promouvoir leurs diffusions et ainsi contribuer à réduire l'implication animal dans ce genre d'étude et cela en accord avec la règle des trois R. L'impact environnemental et le bien-être des animaux seront pris en compte durant toutes les phases de notre projet et tout sera mis en œuvre pour réduire au minimum le stress physique et mental des animaux. Au total, sur les 5 ans du projet 455 rats et 512 souris seront explorés pour mener à bien notre projet.

Les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre l'implication de la fonction ou plutôt de la dysfonction de la perfusion tissulaire du myocarde dans le développement des cardiomyopathies et de l'insuffisance cardiaque chez les personnes diabétiques et d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutique et/ou de préventive. Cette étude s'inscrit dans un projet plus large de recherche translationnelle chez l'homme pour renforcer la place de l'IRM dans la routine clinique et cela comme un outil de prévention, de diagnostic précoce et de suivi des populations à risques en particulier dans les pathologies de désordres métaboliques dont la prévalence continue d'augmenter et demeurant un problème majeur de santé publique.

11289 Le cancer colorectal (CCR) est le 3ème cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes et les femmes, avec 1,4 million de cas et 693 000 décès en 2012. Chez des patients très sélectionnés, chez lesquels le CCR primitif est contrôlé, une résection chirurgicale des métastases pulmonaires (MP) est une option intéressante. En effet, les séries chirurgicales les plus récentes, rapportent des survies à 5 ans allant de 47 à 67%. Malgré ce traitement, 20 à 60% des patients développeront des récurrences pulmonaires, du fait de la présence de micrométastases ne pouvant pas être mise en évidence, ni par l'imagerie, ni par la palpation per opératoire. Des résultats encourageants ont été rapportés sur le traitement des CCR métastatiques (CCRm) pulmonaires par perfusion pulmonaire isolée (PPI) sur des modèles murins et chez l'homme.

De nos jours, le FOLFOX (oxaliplatine, acide folique et de 5-fluorouracil) est la chimiothérapie de 1ère intention pour le traitement des CCRm, mais n'a jamais été évaluée en PPI et il n'existe pas de travaux publiés sur les techniques de chimiothérapie PPI chez le lapin.

L'objectif principal est de réaliser un modèle de cancer colorectal métastatique (CCRm) pulmonaire chez le lapin à partir de cellules VX2 (carcinome invasif) et qui sera traité par PPI (perfusion pulmonaire isolée) de chimiothérapie avec de l'oxaliplatine versus oxaliplatine par voie intraveineuse. Notre objectif est de réaliser à moyen terme des essais de phase I chez l'homme.

Le Remplacement du modèle animal dans ce projet est limité. En effet, la culture de cellules *in vitro* ne permet pas de reproduire les conditions dans lesquelles la chimiothérapie sera administrée à la tumeur dans l'organisme. Les résistances vasculaires des tumeurs et les capacités de diffusion de la chimiothérapie dans la tumeur, ne sont pas les mêmes que celles en *in vitro*. Avant de réaliser un essai de phase I chez l'homme, il convient de réaliser une étude d'efficacité de la technique de PPI chez un modèle animal. Nous avons choisi le lapin, car il est très étudié en cancérologie colorectale métastatique avec traitement locorégional, notamment hépatique. De plus, l'évolution de la maladie métastatique chez le lapin est comparable à celle de l'homme, sur le plan vasculaire et lymphatique.

Dans un objectif de Réduction, du nombre d'animaux utilisés, le nombre de 10 (+-2) lapins a été fixé pour obtenir une évaluation satisfaisante des résultats. 5 lapins pour la mise en place d'un modèle métastatique et 5 lapins pour la mise en place de la technique chirurgicale par PPI (le % de perte autorisé est évalué à 20% de l'effectif total).

Dans un objectif de Raffinement, chaque procédure (pose de cathéter, intubation, ventilation, inoculation) sera réalisée sous anesthésie générale par une équipe maîtrisant l'ensemble de la technique. Les procédures invasives (thoracotomie), vectrices de douleurs majeures, l'apparition des métastases, et l'efficacité du traitement, seront évaluées cliniquement (grille d'évaluation validée par le responsable de la structure du bien-être animal du laboratoire) et radiologiquement par scanner hebdomadaire. Un cathéter veineux central maintenu par un gilet permettra de s'affranchir de ponctions veineuses itératives pour les dosages tout en permettant la libre circulation de l'animal dans la cage, en péri opératoire de la phase de traitement par de perfusion pulmonaire isolée. Les animaux seront hébergés à température réglée (l'animal ventilé sur tapis chauffant). Dans notre modèle, la mortalité ne sera observée uniquement pour les animaux au stade métastatique environ 7 semaines après l'implantation rectale du cancer colorectal VX2.

Durant les procédures sous anesthésie générale, un scope cardiaque permettra de dépister les variations de fréquence cardiaque et une possible dysfonction d'anesthésie pour y remédier rapidement. L'animal sera euthanasié en cas de signes de souffrance. Une évaluation rétrospective de tous les décès sera effectuée à la fin du projet.

11290 L'objectif de ce projet de recherche est d'identifier des composés chimiques ou biologiques pour le développement de nouveaux médicaments dans le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (Graft Versus Host Disease, GVHD). La greffe de cellules souches sanguines est un traitement qui est proposé à des patients souffrant de cancers ou maladies du sang (leucémies, lymphomes etc...). Ce traitement consiste à injecter des cellules sanguines provenant d'un donneur sain au patient receveur dont la moelle osseuse a été partiellement ou totalement détruite. Ce transfert de cellules sanguines chez le patient receveur provoque dans 20 à 80 % des cas la maladie dite du greffon contre l'hôte (GVHD). Elle se caractérise par une réaction immunitaire des cellules du donneur envers les tissus du patient receveur. La GVHD se manifeste par deux phases distinctes appelées GVHD aigüe et GVHD chronique. Lors de la GVHD aigüe, les patients présentent une inflammation des muqueuses intestinales et cutanées. Ces symptômes sont également présents dans la GVHD chronique et sont alors associés à des atteintes au niveau musculaire et pulmonaire. A ce jour, il n'existe aucun traitement de la GVHD.

Dans le but de modéliser cette pathologie incurable, des expériences chez le rongeur montrent que l'irradiation sublétales d'une souris recevant de la moelle osseuse provenant d'une souris donneuse provoque une réaction immunitaire caractéristique du développement de la GVHD. Les manifestations chez le rongeur sont très similaires à celles observées chez l'homme et démontrent de la pertinence de ce modèle. Ce projet sera réalisé dans le respect des animaux et de la règle des 3R.

Remplacement : Afin d'étudier les mécanismes de réaction immunitaires induite par la greffe allogénique, il existe des systèmes de co culture permettant d'évaluer une réponse immunitaire (production d'interleukine par exemple). Cependant, ces expériences ne permettent pas de modéliser la pathologie GVHD dont les caractéristiques sont multiples et dont l'expression varient dans les différents organes. C'est pour cette raison que l'utilisation de ce modèle murin est requis afin de développer et d'évaluer des nouvelles molécules ou stratégies thérapeutiques pour le traitement de la GVHD chez l'homme.

Raffinement : L'ensemble des gestes techniques sur les animaux seront réalisés en accord avec les standards validés par la structure en charge du bien-être animal (irradiation, greffe de cellules, administration des composés etc...). Tout au long des études menées dans le cadre de ce programme, les experts dont le vétérinaire analyseront les conséquences des procédures sur le bien-être des animaux, la validité des résultats scientifiques obtenus, et chercheront à améliorer, si nécessaire, les points limites, la stratégie du suivi clinique et les procédures.

Pour ces études, toutes les mesures sont mises en œuvre pour arrêter, minimiser ou diminuer la souffrance et/ ou détresse de l'animal en cas d'apparition de signe clinique indésirable. Les souris seront pesées chaque jour et observées deux fois par jour afin d'anticiper au maximum les signes de souffrance et les fortes pertes de poids. Ce suivi clinique est effectué par des techniciens formés et compétents. A la fin des études, les souris seront euthanasiées selon la réglementation en vigueur et des prélèvements d'organes seront réalisés.

Réduction : le nombre d'animaux requis pour ces études est le plus faible possible en lien avec la problématique de l'étude et la puissance statistique nécessaire. Entre 3 à 15 souris uniquement seront utilisés par groupe. S'il y a lieu un nombre de 5 souris satellites par groupe pourra être rajouté dans le cas de prélèvement pour des expériences *ex vivo*.

Nombre total dans le projet : 4800 souris sur les 5 ans du projet permettant de réaliser 6 évaluations de composés par an.

11291 Une chambre implantable est un dispositif relié à un cathéter intraveineux placé sous la peau. L'accès intravasculaire (circulation sanguine) par cathétérisation est l'une des procédures chirurgicales les plus courantes en médecine humaine où elle est utilisée pour la chimiothérapie par exemple. Cette technique est pratiquée chez les animaux de laboratoire (souris, rats, lapin, brebis, Primates non-humains...) depuis 35 ans et a été développée comme alternative à la pose de cathéters externes afin d'éviter les risques de thrombose veineuse et d'infection lors de ponctions ou injections intraveineuses répétées, ou bien le risque d'arrachement ou de déplacement du cathéter.

Le cathéter peut rester en place plusieurs mois, voire plusieurs années.

Comme le positionnement de la chambre est uniquement sous-cutané, elle ne fait pas saillie vers l'extérieur et, il n'y a que peu de risque que l'animal y touche, donc pas besoin de pansement de protection.

Nous souhaitons appliquer cette technique au modèle Microcèbe (*Microcebus murinus*). Cette technique est une méthode de raffinement de nos procédures de prélèvement ou injection répétées car elle permet de réduire le temps de manipulation de l'animal, le stress et la douleur. Notre élevage bénéficie de tous les agréments nécessaires, les animaux sont hébergés en groupe et un enrichissement est mis en place à l'aide de branchages, cachettes, cordes, et friandises cachées (vers de farine, fruits variés...).

La cathétérisation et la mise en place de la chambre se feront sous anesthésie générale. Les animaux auront été au préalable prémédiqués et des molécules antidouleur (analgésiques) seront administrées avant, pendant et après la chirurgie. Durant la période post opératoire (1 semaine), les animaux seront hébergés en cages individuelles mais disposées de telle manière qu'elles autorisent les communications visuelles, olfactives et sonores. Puis, dès que la cicatrisation sera complète, ils seront remis en groupe de 4 à 6 individus. Nous serons particulièrement vigilants à toute gêne dans les déplacements des animaux, l'apparition d'une irritation cutanée en regard de la

chambre, l'apparition de signes d'infection. En cas de survenue de l'un de ces critères, le dispositif sera retiré.

Une fois le cathéter et la chambre en place, les prélèvements ou injections sont fait à travers la peau (préalablement anesthésiée à l'aide d'une pommade anesthésiante pour éviter la douleur lors de la ponction de la peau). Afin d'évaluer les particularités anatomiques et d'appréhender au mieux cette technique et de réduire le nombre d'animaux utilisés, la méthode sera pratiquée tout d'abord sur des animaux morts présents dans notre banque d'organes. Puis 5 microcèbes seront implantés par un vétérinaire spécialisé en chirurgie des animaux de laboratoires et maîtrisant cette technique opératoire. Les animaux bénéficieront d'une surveillance accrue tout au long de la procédure et dans les mois qui suivent l'implantation.

Autorisation de projet abrogée par le ministère chargé de la recherche

11292 La pharmacocinétique étudie le devenir de la molécule dans l'organisme. Le devenir du médicament selon les doses utilisées et sa voie d'administration sont étudiés chez l'animal : son absorption, sa distribution par la circulation sanguine, son métabolisme, son élimination.

La pharmacodynamie étudie les effets de la molécule sur l'organisme. Ces effets sont évalués par le suivi des variations de différents paramètres qui peuvent être par exemple biochimiques (changement du taux sanguins d'enzymes hépatiques, du taux de glucose sanguin, modification de la composition des urines.), hématologiques (modifications du taux de globules rouges/blancs.) ou physiologiques (pression artérielle, fréquence cardiaque, respiratoire.).

Les chiens sont régulièrement utilisés pour la recherche biomédicale dans les domaines de santé animale (espèce cible) et humaine.

En tant que sous-traitant de l'industrie pharmaceutique, nous proposons à nos clients de réaliser la phase expérimentale de leurs études.

L'enjeu de ce projet est de réaliser des études chez les chiens qui consistent à administrer aux animaux une molécule à tester et en pratiquant ensuite des prélèvements sanguins par ponction directe dans le but :

- de suivre la concentration sanguine de la molécule (pharmacocinétique).

- de suivre les effets pharmacodynamiques de la molécule (modification de la glycémie, modifications hématologiques).

Des prélèvements urinaires et des prélèvements de bile par l'intermédiaire de cathéters biliaires pourront également être réalisés afin de suivre l'élimination de la molécule ou des modifications dans leur composition (pharmacodynamie). D'autres paramètres pharmacodynamiques pourront être suivis par des appareils de mesures autonomes qui seront placés sur l'animal de manière non invasive ou invasive (chirurgicalement). Les procédures de mise en place des cathéters biliaires et des appareils de mesure autonomes seront décrites dans des projets indépendants.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire la diffusion d'un produit dans le sang des animaux ni d'évaluer les effets d'une molécule sur un ou plusieurs paramètres pharmacodynamiques au niveau de l'organisme entier, il est indispensable de recourir à l'animal entier.

Au maximum pour ce projet, nous prévoyons de réaliser la phase animale des études pharmacocinétiques de 400 produits au maximum, en 5 ans.

Chaque produit à tester fera l'objet d'une étude particulière. On calculera pour chaque étude le nombre d'animaux nécessaire, il sera toujours réduit au minimum, en tenant compte de la variabilité des résultats attendus.

Au total, au maximum 3600 animaux pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet. Le mode d'administration des produits sera fonction du produit à tester mais toujours conforme aux recommandations en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les prélèvements sanguins seront toujours réduits au minimum. Ils pourront être réalisés par ponction avec une aiguille à la veine jugulaire, à la veine céphalique, à la saphène ou via un cathéter placé à la veine céphalique.

Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés généralement par groupe ou en individuel si demandé par le protocole. Dans le cas d'hébergement individuel, une attention particulière sera portée au raffinement et à un enrichissement du milieu adapté pour éviter l'ennui : contact visuel et olfactif entre congénères, surface suffisante de l'hébergement, présence de jouets, de tablettes.

Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place permettant l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets du produit sur l'animal.

11293 Ce projet vise à développer des approches originales basées sur le principe de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) afin de caractériser le métabolisme cérébral fonctionnel dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson idiopathique (MPI) et d'identifier des marqueurs précoces de la pathologie. La spectroscopie RMN du carbone ^{13}C est une technique d'investigation non irradiante, non invasive, n'entraînant pas de douleur ou de souffrance chez l'animal anesthésié et qui permet d'apprécier le métabolisme cellulaire. Cependant à cause de sa faible sensibilité (l'abondance naturelle du ^{13}C n'est que de 1,1%), ce noyau n'est que peu utilisé en RMN. Depuis quelques années, différentes techniques, dites d'hyperpolarisation, ont été développées pour augmenter le signal RMN de ce noyau. En augmentant d'un facteur supérieur à 10 000 le signal du ^{13}C par ces techniques, il est alors possible d'enregistrer le spectre RMN en une fraction de seconde. Ainsi, nous proposons d'explorer de façon dynamique le métabolisme cérébral et ainsi de caractériser les flux de synthèse métaboliques (cycle de Krebs, cycle Glu/Gln, interactions neurones-glie) à l'état normal et après dénervation dopaminergique.

Pour cela, ce projet se décline en 2 objectifs : (i) hyperpolariser des précurseurs originaux permettant de caractériser le métabolisme fonctionnel et (ii) démontrer leur intérêt lors d'études *in vivo* sur le modèle rat de la MPI.

Pour mener à bien ces objectifs, le choix des précurseurs pressentis (glutamate, glutamine, alpha-cétoglutarate et glucose marqués au ^{13}C) sera validé *in vivo* chez le rat sain. Seules des approches menées *in vivo* chez un modèle animal peuvent améliorer la connaissance du cerveau et de son développement. C'est dans ce contexte que se situent nos travaux. Le cerveau des rongeurs reproduit de façon assez similaire les structures qui sont affectés chez l'homme dans la maladie de Parkinson. La détection du précurseur dans le cerveau et la synthèse de métabolites dérivés de ce précurseur seront étudiées. Pour cela, un accent particulier sera apporté au mode de préparation des échantillons et aux modalités d'injection afin de détecter le métabolisme *in vivo* au niveau cérébral chez l'animal. 5 rats sains par précurseur seront utilisés pour cette étape de validation.

La capacité d'une molécule à passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) est une étape clé des études sur le métabolisme cérébral. Si l'administration intra-veineuse ne permet pas la détection du précurseur marqué au niveau du cerveau, une procédure de rupture de la BHE sera mise en place. Dans ce cas 5 animaux supplémentaires seront ajoutés.

L'application à l'étude du métabolisme fonctionnel cérébral chez le rat, modèle de maladie de Parkinson se fera chez 10 animaux contrôles pour chaque précurseur et sera comparé aux résultats obtenus chez 10 rats modèles de maladie de Parkinson.

Ce projet sur 5 ans sera réalisé sur 105 rats (± 15 rats si l'étape de validation nécessite un protocole de rupture de la BHE).

La règle des 3R (Réduire, Remplacer, Raffiner) sera appliquée conformément aux décrets relatifs à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Le caractère non-invasif de la méthode RMN chez l'animal anesthésié permet tant que possible des examens répétés chez un même animal, ce qui entraîne une réduction du nombre d'animaux utilisés

pour ces développements. Toute intervention chirurgicale sera pratiquée sous anesthésie profonde et des analgésiques administrés en péri-opératoire. Les conditions d'hébergement (plusieurs animaux par cage, stimulation régulière par un expérimentateur), le recours à l'anesthésie pendant les acquisitions et la définition au préalable de points limites permettent de réduire l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subis par les animaux.

11294 Environ 15% des cas d'infertilité masculine ont une origine immunologique, de l'inflammation chronique à la réaction auto-immune qui détruit les spermatozoïdes. Notre objectif est d'acquérir une meilleure connaissance du système immunitaire et de son organisation au sein des organes sexuels mâles, et plus particulièrement au niveau post-testiculaire. En effet, suite à leur production dans le testicule, les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant au cours d'une phase de maturation post-testiculaire. Du point de vue immunologique, il y a un véritable challenge : contrôler efficacement les pathogènes entrants tout en évitant un emballement de la réponse immunitaire pouvant mener à une réponse auto-immune et donc à une infertilité. Ce deuxième axe fait l'objet d'un projet de recherche au sein de l'équipe. Actuellement, aucune publication ne décrit le ganglion drainant de l'épididyme alors même qu'il est le lieu d'initiation des réponses immunitaires. Notre objectif est donc d'identifier le ganglion drainant de l'épididyme murin par l'injection d'un antigène fluorescent dans l'organe et son suivi en temps réel. Ce projet s'applique à combler l'exigence de la règle des 3R. En effet, le nombre d'animaux est réduit car nous aurons recours à 10 souris mâles BALB/c sauvages afin d'atteindre notre objectif, qui est purement descriptif. Notre étude portant sur l'immunité des organes reproducteurs mâles, nous utiliserons des souris mâles sexuellement matures, âgées de trois à six mois. Le deuxième R s'attache au raffinement des conditions de vie des animaux ou la souffrance créée par l'opération et l'injection, réalisées sous anesthésie générale, est modérée selon les critères officiels (arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales). Cependant, les animaux seront supplémentés en anti-douleurs après l'opération et surveillés jusqu'à leur réveil puis quotidiennement. Une prostration de vingt-quatre heures ou une altération du pelage ou de l'appétit entraînera leur sortie du protocole, voire leur euthanasie, en fonction de la gravité de leur état. Finalement, le troisième R, qui vise à remplacer l'expérimentation sur animaux ne peut malheureusement pas s'appliquer dans notre étude. En effet, le recours au modèle animal est ici incontournable étant donné que nous devons suivre la migration de la molécule fluorescente au cours du temps. Notre choix du modèle murin repose sur le fait que la souris est une référence en immunologie. De plus, l'objectif à long terme est d'étudier la réponse immune mise en place dans l'épididyme murin et de nombreux mécanismes, cellules immunitaires et cytokines sont communs à l'homme et à la souris. Cette première étape est indispensable au bon déroulement du projet qui amènera à une meilleure compréhension de l'environnement immun de l'épididyme, des mécanismes mis en jeu dans les réponses aux pathogènes du tractus uro-génital et pourrait à terme permettre une prise en charge adaptée de l'infertilité masculine.

11295 L'augmentation de la taille du cerveau au cours de l'évolution humaine est remarquable. Elle reposerait en partie sur l'accroissement substantiel du budget énergétique lié à une alimentation plus riche, ou sur un transfert d'énergie économisée sur certains organes/fonctions biologiques (théorie du compromis énergétique). Une méta-analyse récente montre qu'une réduction majeure du bol alimentaire de l'Homme s'est opérée (66% de moins qu'un primate de taille similaire) sans diminution de l'apport calorique journalier. L'adaptation à un régime très réduit en quantité (mais plus riche en énergie) aurait permis de réduire considérablement le coût de la digestion, l'énergie libérée pouvant être allouée au développement de la masse cérébrale. Cependant, le gain énergétique possible n'est pour l'instant extrapolé qu'à partir de modèles phylogénétiques éloignés des primates.

Le projet propose d'évaluer le coût de la digestion et le gain énergétique d'une restriction majeure de la taille de repas isocaloriques chez un primate omnivore. Bien qu'abordant des mécanismes physiologiques de très court terme, le projet est dédié à la compréhension de processus évolutifs à long-terme. La découverte d'un mécanisme d'économie d'énergie en relation avec le changement

d'alimentation permettra des avancées théoriques sur les mécanismes évolutifs associés à l'accroissement de la masse cérébrale dans le genre Homo.

La dépense énergétique sera mesurée à l'aide d'un dispositif de calorimétrie indirecte. Le protocole permettra de compartimenter la dépense métabolique liée aux différentes activités de l'organisme pour extraire le coût de la digestion.

Pour remplir l'objectif du projet, 3 groupes expérimentaux seront constitués afin de comparer des animaux nourris avec soit une quantité contrôle, soit une ration diminuée en volume mais isocalorique, soit une ration diminuée en volume et en calories.

Tous les animaux utilisés dans ce projet seront des jeunes mâles adultes (2-4 ans). Un implant sera inséré dans la cavité abdominale sous anesthésie générale afin d'enregistrer en continu la température corporelle et l'activité locomotrice, et en laissant un temps de récupération suffisant pour l'animal. A la fin de l'expérience de modification du régime alimentaire, une prise de sang sera réalisée pour permettre la mesure d'hormones impliquées dans le contrôle du métabolisme. Afin de répondre à l'exigence de réduction du nombre d'animaux mais assurer tout de même un pouvoir statistique suffisant pour les effets attendus, les procédures expérimentales seront réalisées sur un nombre maximal de 8 animaux adultes par groupe expérimental. Au total, 24 animaux seront donc utilisés pour ce projet. Le but de cette étude étant de caractériser aux plans intégratifs les coûts de la digestion dans un contexte physiologique, une grande attention sera portée au maintien des conditions optimales pour le bien-être des animaux en essayant d'être le moins intrusif possible. L'indicateur privilégié pour le suivi du bon rétablissement de l'animal après application des procédures expérimentales sera les variations anormales de masse corporelle. Dans le contexte saisonnier, les variations de poids peuvent aller jusqu'à 10% en une semaine. Une perte de poids sera considérée comme pathologique à partir du moment où ce seuil sera dépassé. Ce critère sera pris en compte avec d'autres critères comme la prostration, l'état de forme général de l'animal (réactivité, agressivité, etc). Enfin, un maximum d'attention sera également apporté à la maîtrise des techniques utilisées afin de limiter au mieux le stress et la douleur chez les animaux expérimentés.

11296 Le cerveau est isolé de la circulation sanguine par la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui est une barrière très étanche, limitant fortement le passage de molécules dans le cerveau. Cette propriété d'étanchéité de la BHE constitue une protection du système nerveux central (SNC) vis-à-vis de molécules présentes dans la circulation sanguine et potentiellement neurotoxiques, mais constitue également un frein à l'action thérapeutique de nombreux médicaments qui ne peuvent pas franchir cette barrière. La BHE est aussi très importante pour réguler les échanges de molécules endogènes (fabriquées par l'organisme) entre le sang et le cerveau ; dans certaines conditions pathologiques, une dérégulation de la BHE pourrait modifier ces échanges et participer ainsi au développement de certaines pathologies du SNC telle la maladie d'Alzheimer. Pour toutes ces raisons, il est important de comprendre quels sont les mécanismes mis en jeu au niveau de la BHE pour réguler ces échanges de molécules entre le sang et le cerveau. Parmi ces mécanismes, nous nous intéressons particulièrement à une famille de protéines, appelée ABC (ATP-binding cassette), dont le rôle est de transporter de nombreux médicaments ainsi que certaines molécules endogènes du cerveau vers le sang. Notre projet, d'une durée de cinq ans, a donc pour objectif d'étudier les échanges sang-cerveau de 40 molécules d'intérêt dont certains médicaments actuellement sur le marché ou en cours d'évaluation pour une éventuelle mise sur le marché, ou encore certaines molécules endogènes impliquées dans le développement de la maladie d'Alzheimer.

L'étude du passage de molécules à travers la BHE est très difficile *in vitro* car les modèles existant ne reproduisent pas une BHE intacte et fonctionnelle. Il existe des souris transgéniques chez qui une ou plusieurs protéines de transport de type ABC ont été invalidées, ce qui permet d'étudier spécifiquement leur implication dans le transport de nos molécules d'intérêt. C'est pourquoi nous travaillons avec des souris sauvages et sur quatre modèles de souris transgéniques invalidées pour un ou plusieurs transporteurs ABC que nous élevons au sein de l'animalerie centrale de notre établissement. Nous aurons besoin, pour étudier nos 40 molécules d'intérêt, de 1120 souris transgéniques et 1120 souris sauvages, soit un total de 2240 souris, réparties sur cinq années de

travail. Ainsi, l'ensemble des souris de nos élevages sera utilisé pour nos expériences (mâles et femelles) et le nombre d'animaux par groupe sera de 7, ce qui, d'après des études précédentes utilisant des procédures similaires, correspond au plus petit nombre de souris permettant une validité statistique de nos résultats.

Afin de limiter le plus possible la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale. Nous injecterons nos molécules d'intérêt dans la circulation sanguine des souris et nous mesurerons leurs concentrations dans le cerveau quelques minutes après l'injection et euthanasie de la souris.

La réalisation de ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le transport de molécules à travers la BHE, d'optimiser les médicaments utilisés actuellement et potentiellement d'en développer de nouveaux, et de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

11297 Chez l'Homme, en plus de son rôle dans la vision, la lumière exerce une influence importante sur la physiologie et le comportement. Notamment, il est aujourd'hui connu que la lumière peut moduler les performances cognitives et l'humeur. L'objectif de notre projet est de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents, notamment par le biais d'une action directe non circadienne de la lumière, mais également via une action sur l'homéostat de sommeil et sur les centres supérieurs du cerveau à partir des projections issues des cellules ganglionnaires à mélanopsine de la rétine. Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes neurophysiologiques qui sous-tendent les phénomènes de dépression saisonnière observés chez l'homme, les déficits cognitifs associés aux troubles du sommeil ainsi que l'effet positif de la luminothérapie sur les pathologies de dépression et les troubles cognitifs.

Grâce à un modèle de souris ne produisant pas la mélanopsine, et donc ne transmettant pas l'information lumineuse non visuelle au cerveau, nous pourrions évaluer l'effet spécifique de cette intégration d'information sur le comportement en comparant des animaux dépourvus de mélanopsine (Opn4^{-/-}) et des animaux wild type (Opn4^{+/+}) suite à différentes expositions lumineuses.

L'utilisation de l'animal entier est nécessaire au vu de la question posée, impliquant des systèmes biologiques divers et complexes allant de la rétine, avec l'intégration du signal lumineux, au comportement de l'animal, en passant par des systèmes neuronaux complexes.

Afin d'optimiser le nombre d'animaux, chaque lot pourra subir différents paradigmes lumineux et test comportementaux consécutifs en respectant un temps minimal entre chaque paradigme afin d'obtenir une récupération complète de l'architecture naturelle du sommeil entre deux conditions et ne pas influencer les résultats des tests comportementaux.

Dans le cadre du raffinement des conditions d'hébergement, les animaux sont maintenus jusqu'à l'expérience en groupe sociaux, un enrichissement est réalisé par l'ajout de nids. D'autres enrichissements tels que tubes, maisons ou balancettes ne peuvent être utilisés car empêcheraient l'exposition des animaux à la lumière et donc fausseraient les résultats du projet. Un suivi quotidien renforcé est réalisé durant les 7 jours qui suivent la chirurgie. Ce suivi consiste en l'observation de la posture de l'animal (notamment identification des positions de prostration), de l'état du poil, du poids, des mimiques faciales ainsi que de l'état des cicatrices. L'apparition ou la variation de l'un de ces paramètres, ainsi qu'une perte de poids significative (au moins 10%, sans récupération dans la semaine) pouvant être le signe d'une souffrance ou d'un mal-être, l'animal est retiré de l'expérience et mis en observation pendant plusieurs jours, un avis vétérinaire est demandé le cas échéant, et un traitement est mis en place.

Au vu de la variabilité dans les réponses comportementales, le projet, effectué sur une durée maximale de 5 ans, implique un effectif total maximal de 650 souris Opn4^{+/+} et 650 souris Opn4^{-/-} mâles adultes soit un total maximal de 1300 animaux.

11298 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie dévastatrice, avec une prévalence de 10 à 20 cas pour 100000 habitants, une médiane de survie de 3 ans après diagnostic. Il n'existe pas de traitement efficace de la FPI connu à ce jour.

Notre équipe s'intéresse au rôle d'une petite protéine de choc thermique (HSP), l'HSP27 dans le développement de la fibrose pulmonaire. Nous avons jusqu'alors montré que ces protéines présentes à l'intérieur des cellules pulmonaires participent au développement de la maladie. Or, des données récentes montrent que HSP27 libérée dans le milieu extracellulaire a une fonction clé dans la communication intercellulaire impliquée dans le développement de la FPI. Il nous paraît donc important de caractériser les effets de HSP27 sécrétée par les cellules pulmonaires dans le processus de fibrogenèse pulmonaire.

Les travaux de l'équipe montrent que la régulation des voies pro- et anti-fibrotiques impliquant les HSP est complexe et concerne différentes cellules pulmonaires, mésothéliales, épithéliales et fibroblastiques, interagissant dans un système dynamique, ainsi que des processus de régulation immunitaires généraux et régulés par d'autres organes. C'est pourquoi il est indispensable de travailler sur une pathologie induite *in vivo* chez l'animal, pour bien comprendre le rôle de ces médiateurs dans les mécanismes de déclenchement et de progression de la fibrose. Si nous arrivons à montrer que la libération d'HSP27 par les cellules pulmonaires est une étape clé d'évolution de la fibrose, l'intérêt du développement de molécules inhibitrices de HSP27 pour traiter les patients souffrant de FPI en sera renforcé.

Notre modèle expérimental de fibrose pulmonaire consiste en l'administration chez la souris d'un médicament anticancéreux, la bléomycine, connu pour ses effets profibrosants au niveau pulmonaire. C'est le modèle expérimental d'induction de la fibrose pulmonaire internationalement validé.

Notre projet nécessite 116 souris. 84 souris seront nécessaires pour tester les effets de l'administration chez la souris d'HSP27 en plus de la bléomycine, sur le développement de la fibrose pulmonaire. Dans une deuxième procédure, 32 souris seront nécessaires à l'exploration des mécanismes cellulaires impliqués dans les effets d'HSP27. Le nombre d'animaux nécessaire à l'étude correspond au nombre minimum permettant une étude statistique.

Nous porterons une attention particulière au respect de l'espace vital des animaux. Ils seront répartis 6 par cage. Les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé (lumière, température, bruit). Ils bénéficieront d'un enrichissement du milieu de vie par des éléments creux plastiques (tunnels), et des bandelettes de papiers (permettant leur isolement dans la cage). Avant l'administration de la bléomycine, les animaux bénéficieront pendant une semaine d'une alimentation enrichie (consistant en aliments géliifiés et croquettes directement disponibles sur la litière), pour limiter la perte de poids induite par la bléomycine, et cette alimentation sera maintenue jusqu'à l'euthanasie des animaux. L'administration de la bléomycine et de l'HSP27 seront réalisées sous anesthésie générale des animaux. Après chaque administration, nous observerons la souris à son réveil pour vérifier la reprise de sa mobilité et de son activité dans la cage. Au cours du développement de la fibrose et dès la première administration, les animaux seront surveillés au jour le jour par mesure du poids et observation de leur état général (aspect du poil) et de leur comportement (mobilité). Une perte de poids supérieure à 20% du poids initial entraînera l'euthanasie de l'animal. Notre protocole se déroule sur 21 jours. Ce délai est suffisant pour visualiser l'installation d'une fibrose sans attendre a priori de mortalité à la fin de l'expérimentation.

11299 Un implant cochléaire est un dispositif qui peut être placé chirurgicalement dans l'oreille, permettant ainsi une stimulation auditive chez les patients présentant une surdité profonde. Certains types d'implants, permettent de conserver une partie de la fonction acoustique naturelle de l'oreille tout en réalisant une stimulation électrique complémentaire. Les études cliniques chez l'homme ont montré le bénéfice de ce type de double stimulation. Cependant, d'un point de vue fondamental, à ce jour, aucune donnée n'est disponible sur la façon dont le cerveau est activé et comment il analyse cette double stimulation, limitant de ce fait les possibilités de réhabilitation des patients sourds. Dans l'objectif de mettre au point un modèle animal permettant d'étudier l'activation cérébrale lors de stimulations auditives complexes, la présente étude préliminaire vise à déterminer s'il est possible

de visualiser en Imagerie de Résonance Magnétique (IRM) rehaussée par injection d'un agent de contraste, l'activation des zones du cerveau impliquées dans l'audition, lors de stimulations acoustiques seules. Trois conditions de stimulations acoustiques seront analysées, à savoir des stimulations avec des sons graves, mediums et aigus, sur 12 animaux au maximum. Si cette étude préliminaire montre que la méthode permet de visualiser des activations cérébrales différentes selon le type de sons proposés, une deuxième étude fera l'objet d'une nouvelle demande avec des gerbilles porteuse d'implants

Ce projet s'inscrit dans une démarche de respect des 3R :

- Remplacement : Ce travail ne peut être réalisé chez l'homme car le produit de contraste utilisé n'a actuellement pas d'autorisation de mise sur le marché chez l'homme. La gerbille de Mongolie est fréquemment utilisée car elle présente des caractéristiques auditives très proches de l'Homme.

- Réduction : L'usage de l'IRM permet de tester plusieurs conditions expérimentales (3) sur un même animal ce qui permet de réduire le nombre d'animaux à un maximum de 12 pour cette étude préliminaire.

- Raffinement : les stimulations auditives et l'examen d'IRM sont non invasifs. Un suivi journalier permettra de veiller au bon état de santé des animaux tout au long de l'expérimentation.

11300 Dans le cadre des traitements anticancéreux, la recherche médicale s'oriente vers de nouvelles stratégies. Ces dernières années ont vu une véritable explosion de nouvelles molécules thérapeutiques, développées par l'industrie pharmaceutique et biotechnologique. Cela a notamment été possible grâce à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement et la dissémination des cellules tumorales, le tout permettant une prise en charge des patients plus efficace. Si la caractérisation de l'effet anti-tumorale de ces molécules est systématiquement évalué en laboratoire, l'étape d'évaluation *in vivo* (chez l'animal) reste bien souvent indispensable par la suite, afin de confirmer l'effet bénéfique de telles ou telles molécules.

L'utilisation de molécules *in vivo* nécessite néanmoins de prendre des précautions afin de limiter les effets délétères tout en conservant une efficacité thérapeutique importante.

Notre projet a pour but de définir et d'encadrer les modalités de l'évaluation de potentiels effets délétères *in vivo* (chez la souris) des molécules qui sont susceptibles d'être utilisées chez l'homme.

Ces tests chez l'animal seront bien évidemment précédés de tests en laboratoire.

Ces études de toxicité se dérouleront suivant la méthode de l'escalade de doses. Ainsi, une première dose faible sera testée (définie en fonction des résultats des tests en laboratoire), puis une dose moyenne (10 fois la dose envisagée) et enfin une dose forte (100 fois la dose envisagée). Ces données permettront ainsi d'avoir une idée quant à la marge de sécurité sans toxicité du produit utilisé. Le passage d'une dose à une autre ne sera réalisé que si les doses plus faibles n'engendrent pas d'effets délétères chez les animaux.

Les signes de toxicité sur le plan clinique (aspect, poids, prise de nourriture, de boisson, etc.) seront recherchés.

L'étude des effets délétères sera complétée par l'analyse de paramètres sanguins et, au terme de l'expérimentation, par des analyses anatomo-pathologiques.

Pour cette étude, des lots de 5 souris seront utilisés. Ainsi, pour chaque molécule testée, nous serons amenés à utiliser entre 10 et 20 animaux : 1 lot contrôle "non traité", et 1 lot par dose.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 200 animaux (10 molécules à tester).

Au regard de la règle des 3R

Remplacer : L'objectif de ce projet est d'évaluer chez l'animal la potentielle toxicité de nouvelles molécules anticancéreuse avant une application chez l'homme. Cela ne peut donc pas être remplacé par des modèles de laboratoire.

Réduire : Afin de réduire la quantité d'animaux utilisée les différentes étapes seront réalisées successivement.

Les lots utilisés seront de 5 souris, ce qui est suffisant pour avoir une bonne idée de la présence d'effets délétères.

Raffiner : Pour limiter toute souffrance animale, nous procéderons à un suivi très régulier des animaux et au moindre signe clinique significatif, nous procéderons à l'arrêt de l'expérimentation. Les procédures de prélèvements sanguin seront réalisées sous procédures d'anesthésie adaptées.

11301 Dans le cerveau, les neurones communiquent entre eux en libérant des substances au niveau de points de contact appelés synapses. Cette libération dépend de l'activité électrique du neurone et permet de transmettre le message d'un neurone à l'autre. Ainsi, la fréquence et la quantité de substances à transmettre dépendra directement de l'activité électrique du neurone. Ce mécanisme est aujourd'hui bien connu. Mais pour atteindre la synapse, ces transmetteurs doivent d'abord être transportés depuis leur lieu de production (le neurone) jusqu'à leur destination finale (la synapse). Et pour être efficace, ce transport doit pouvoir répondre dans les plus brefs délais à l'activité du neurone afin de transmettre le message correctement. Comment cette réponse est-elle alors régulée ?

Le présent projet s'intéresse à cette question en proposant d'étudier la dynamique de transport des transmetteurs le long de l'axone en fonction de l'activité électrique du neurone. Il s'agira également de déterminer l'influence de ce transport sur la capacité de transmission au niveau de la synapse.

Nous avons déjà déterminé les caractéristiques de ce transport axonal *in vitro* à l'aide de cultures cellulaires. Cependant, le cerveau étant organisé en réseaux neuronaux extrêmement complexes, nous cherchons maintenant à valider nos résultats *in vivo*, dans un environnement physiologique dense et organisé. Pour cela, nous utiliserons la technique d'imagerie bi-photonique afin de visualiser le transport de molécules fluorescentes le long de l'axone dans des tranches fraîches de cerveau de souris. Les molécules fluorescentes seront injectées dans le cerveau de l'animal par chirurgie stéréotaxique puis l'animal sera sacrifié pour préparer des tranches de cerveaux pour l'imagerie. Nous manipulerons également, par injections stéréotaxiques, des acteurs moléculaires clés identifiés *in vitro* afin de valider leur pertinence *in vivo*.

La souris apparaît comme le modèle de choix pour ce projet compte-tenu de la similarité de l'organisation anatomo-fonctionnelle de son cerveau avec celle de l'homme. Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude est de 469, regroupé en 2 procédures expérimentales. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant un nombre suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Notamment, dès que possible, l'animal sera utilisé comme son propre contrôle afin de diminuer le nombre de groupes expérimentaux nécessaires (principe de réduction).

Ce projet implique de la neurochirurgie correspondant à un niveau de douleur de classe modérée. La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance apparaissent (principe de raffinement).

Le projet fait suite à une étude *in vitro* qui a permis de déterminer les paramètres et les acteurs impliqués dans la régulation. Il s'agit maintenant d'étudier leur rôle au sein d'un réseau neuronal *in vivo*, dans le contexte physiologique et organisé du cerveau. Il nous est donc impossible de remplacer l'animal vivant par des cultures cellulaires ou des simulations informatiques (principe de remplacement).

11302 Afin de lutter contre l'augmentation des maladies cardiovasculaires, de nouvelles stratégies visant à diminuer l'hypercholestérolémie chez les patients, voient le jour. Récemment une nouvelle voie d'élimination du cholestérol a été mise en évidence : l'excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE). Les micronutriments liposolubles qui partagent des voies de transport avec le cholestérol pourraient également subir cette excrétion trans-intestinale. Cette situation serait particulièrement néfaste, car le statut de ces micronutriments est déjà faible dans la population générale.

Le but de ce projet est de vérifier l'existence d'un efflux trans-intestinal des micronutriments liposolubles (vitamine A, D, E, K et lutéine en particulier) et d'identifier les protéines membranaires responsables de cette excrétion. Pour cela, nous utiliserons maximum 270 souris mâles déficients en ABCB1a et ABCB1b (ABCB1a/b KO), en ABCG5 et ABCG8 au niveau intestinal (ABCG5/8 iKO), ou surexprimant SR-B1 (SR-B1 tg), ainsi que leurs contrôles appariés sur fond génétique FVB ou C57Bl/6. Ces souris seront réparties en maximum 30 groupes de 9 souris.

Dans un premier temps, nous mesurerons de façon directe le passage des micronutriments liposolubles du compartiment sanguin vers la lumière intestinale sur des souris contrôles. Puis nous identifierons les protéines membranaires responsables de cet effet par l'utilisation de modèle de souris transgéniques.

Cette étude prend en compte la règle des 3Rs :

Remplacement :

A l'heure actuelle, aucune méthode de substitution *in vitro* ne permet d'étudier l'excrétion trans-intestinale des micronutriments liposolubles tout en suivant leur excrétion biliaire. La souris est un modèle de choix car elle présente un système de digestion et d'absorption proche de celui de l'homme. Ainsi, Le recours au modèle animale demeure la meilleure approche pour étudier l'excrétion trans-intestinale des micronutriments liposolubles.

Réduction : Pour chacune des conditions, et compte tenu de la variabilité interindividuelle existant chez la souris, des groupes de 9 individus seront utilisés. Le nombre d'animaux utilisé dans cette étude est le minimum nécessaire pour assurer la validité statistique des phénomènes observés. Cependant, l'étude des différentes conditions sera réalisée (ou non) en fonction des résultats préliminaires obtenus sur la lignée cellulaire intestinale humaine Caco-2. De cette manière, il sera possible de réduire significativement le nombre d'individu.

Raffinement : Tous les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale à la kétamine/xylazine (90/10 mg/kg). Les animaux seront hébergés en cage de 2 à 4 individus et l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo et de nid végétal tout au long de l'expérimentation. Les animaux auront accès *ad libitum* à la nourriture jusqu'à 2 heures avant le début de l'expérimentation et à l'eau jusqu'à la fin de l'expérimentation. Un délai minimum de 7 jours d'acclimatation des souris sera respecté.

11303 La lipolyse correspond à une dégradation enzymatique de la matière grasse laitière qui conduit à l'accumulation d'acides gras libres (AGL) dans le lait. L'accumulation dans le lait et les produits laitiers de ces AGL issus de cette dégradation provoque l'apparition de goûts rance et butyrique ; elle contribue aussi au goût amer même si cette saveur est plus généralement associée aux produits issus de la protéolyse (dégradation des protéines). La plupart des consommateurs ne tolère pas la saveur d'un lait dont la teneur en AGL est supérieure à 1,2 milliéquivalents (meq)/100 g de matière grasse. Les laits qui présentent des taux de lipolyse élevés à leur arrivée en laiterie sont donc écartés de la chaîne de production. Cette non-valorisation du lait entraîne outre le gaspillage de matières premières, des pertes financières pour les entreprises.

Le taux de lipolyse est parallèlement devenu un critère de paiement du lait en Bretagne depuis 2012. Le lait de référence doit contenir moins de 0,89 meq d'AGL pour 100 g de matières grasses. Au-dessus de cette valeur, le point de pénalité est de -3,049 € pour 1000 L.

La lipolyse du lait affecte donc à la fois l'aptitude à la valorisation du lait par le transformateur et le revenu de l'éleveur.

Depuis les années 2000, les industries laitières constatent de nouveau une augmentation des phénomènes de lipolyse dans les laits de collecte en France. Parfois, aucune cause n'est identifiée. Les intervenants en élevage peinent à conseiller les éleveurs pénalisés pour des niveaux de lipolyse trop élevés. Globalement, la filière manque de références récentes sur les facteurs de variations de la lipolyse du lait.

Des premiers essais indiquent que l'effet individuel (génétique) et l'alimentation sont des facteurs susceptibles d'influencer la lipolyse du lait.

L'objectif de cet essai est d'étudier, selon la susceptibilité des vaches à la lipolyse, les mécanismes moléculaires de la lipolyse associés à une restriction alimentaire modérée (100 % ou 65 % des quantités ingérées à volonté) chez la vache laitière. Nous allons travailler avec 44 vaches laitières pendant 6 semaines.

Nous veillerons au respect de la règle des 3R : remplacement, réduction, et raffinement. Le nombre minimum d'animaux nécessaires à la mise en évidence de différences entre les traitements est calculé. Les animaux sont maintenus dans un environnement adapté à leur besoin. L'ingestion et la production de lait de chaque vache en réponse à une alimentation classique seront au préalable mesurées pendant une période pré-expérimentale. L'intégration de ces mesures préliminaires caractérisant chaque vache dans l'analyse statistique permet de réduire le nombre d'animaux à utiliser pour tester l'effet de la restriction alimentaire sur la lipolyse du lait. Le nombre de prélèvements sur les animaux sera également réduit au minimum. Ces deux derniers points permettront de répondre au principe de « réduction » des 3R. Enfin, une attention particulière sera portée au bien-être des animaux suivis (ingestion, état de santé général), et toute indication de mal-être des animaux conduira à les sortir de l'expérimentation, en accord avec le vétérinaire, respectant ainsi le principe de « raffinement » des 3R. Toutes les précautions seront prises pour atténuer une éventuelle douleur liée au prélèvement. Cette expérimentation se déroulera dans des conditions proches de celles d'un élevage classique.

11304 L'expérimentation animale s'effectue dans un cadre réglementaire national. Les personnes ayant suivi une formation initiale réglementaire (formations niveau A ou B), doivent valider leurs compétences pour la réalisation des gestes techniques nécessaires à leur pratique expérimentale. Le présent projet concerne deux formations courtes, pratiques, et encadrées par du personnel zootechnique qualifié, que notre établissement organise pour l'apprentissage de gestes techniques simples sur la souris : contention, injection intrapéritonéale, lecture de l'identification individuelle lors de la formation 1, et prise de sang lors de la formation 2. Ces formations ont pour but d'apporter et valider des compétences appliquées à du personnel nouvellement impliqué en expérimentation animale ou bien pour lequel il est nécessaire de réapprendre ces gestes.

Ce programme est mis en place avec la Structure du Bien-Etre Animal et le Responsable du suivi des compétences de l'établissement, et assurera durablement sécurité et bien-être à la fois des souris et des expérimentateurs. La qualité des gestes alors maîtrisés garantira également la qualité des résultats expérimentaux qui seront générés dans les projets ultérieurs.

Nous avons estimé à 30 et 10 personnes à former respectivement à la formation 1 et 2, soit 1000 souris pour 5 ans. Ces souris seront des animaux réformés, à phénotype non dommageable, provenant des élevages de l'établissement et ne seront pas produits à cette fin.

L'apprentissage de ces gestes ne peut être réalisé qu'en condition réelle sur animal vivant. Afin de garantir le minimum d'inconfort chez la souris, l'apprentissage sera graduel : après une première phase d'apprentissage sur documents (films et schémas), la contention se fera tout d'abord sur individus connus pour être calmes, puis sur individus plus vifs. La contention devra être maîtrisée avant de passer à la pratique des autres gestes. De même, l'apprentissage de l'injection IP se fera au départ avec seringue sans aiguille. La validation de la qualité de l'injection sera validée grâce à un colorant vital après euthanasie de l'animal. Les personnes ayant validé ces compétences pourront si nécessaire suivre la séance dédiée à l'apprentissage des techniques de prélèvement sanguin. Pour certaines de ces techniques, une anesthésie sera réalisée pour le confort de l'animal. A la fin de ces sessions, les animaux seront euthanasiés afin d'apprendre également ces gestes opératoires. Certains gestes ici ne sont pas des procédures au sens réglementaire et ne nécessitent alors pas de demande d'autorisation. Cependant, elles sont citées ici afin de permettre une meilleure compréhension du programme de formation. La validation de ces formations sera inscrite dans les livrets de compétence des participants.

11305 Pour un grand nombre d'espèces, la mère joue un rôle majeur dans le développement de ses jeunes. Elle peut en effet influencer leur trajectoire comportementale de par ses influences génétiques et non génétiques. Dès la période prénatale, la mère peut agir sur les caractéristiques

des œufs. C'est également au cours de cette phase que se mettent en place les premières interactions vocales. Chez plusieurs espèces d'oiseaux, l'embryon commence à émettre des vocalisations durant les derniers jours d'éclosion, induisant des réponses vocales et comportementales chez la mère. Ces échanges vocaux interviennent aussi dans les processus d'empreinte filiale et de reconnaissance vocale. Après l'éclosion, les interactions vocales sont particulièrement importantes y compris chez les oiseaux nidifuges. La mère vocalise en situation de danger, lorsque ses jeunes s'éloignent ou encore en présence de nourriture.

Chez la caille japonaise (*Coturnix c. japonica*), le répertoire vocal et plus particulièrement les vocalisations maternelles ont déjà été décrites. Toutefois, les interactions vocales mère-jeunes durant la période de maternage n'ont jamais été caractérisées. Dans cette étude, nous souhaitons comparer les échanges vocaux de jeunes élevés par des mères expérimentées (qui expriment des comportements maternels appropriés) ou des mères inexpérimentées (qui expriment moins de soins maternels et dont les comportements sont moins appropriés).

Nous utiliserons 19 femelles et 38 cailleaux afin de constituer 11 groupes de 2 cailleaux maternés par une mère déjà expérimentée et 8 groupes de 2 cailleaux maternés par une mère naïve. Une vingtaine de cailleaux supplémentaires seront également prévue pour remplacer des individus malades ou blessés. Au total, nous utiliserons donc 77 oiseaux.

Les interactions vocales mère-jeunes seront enregistrées durant les heures suivant l'adoption des cailleaux (J2) mais aussi durant toute la période de maternage (J3 à J11). Les enregistrements seront réalisés dans 3 contextes expérimentaux : le jeune seul, le jeune en interaction vocale avec la mère et le jeune en interaction visuelle et vocale avec la mère. Des observations comportementales permettront de caractériser le profil comportemental de chaque mère.

Ce projet respecte la règle des 3R.

- Remplacement : l'étude repose sur l'observation comportementale des animaux et l'enregistrement de leurs vocalisations, aussi nous ne pouvons pas nous soustraire à l'utilisation d'animaux vivants.
- Réduction : nous estimons que le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour obtenir une puissance statistique suffisante.
- Raffinement : Aucune pratique invasive n'est requise dans le cadre du projet et un suivi journalier permettra de veiller au bon état de santé des animaux tout au long de l'expérimentation.

11306 Le DHA (Acide Docosahexaénoïque) est un acide gras polyinsaturé (AGPI) n-3 qui participe au bon développement du cerveau et de la rétine chez l'enfant s'il est présent en quantité suffisante dans les tissus. Il peut être synthétisé à partir d'acides gras précurseurs présents dans l'alimentation comme l'ALA (Acide Alpha-Linolénique). Chez les nourrissons, le DHA ou son précurseur sont apportés par les laits maternel ou infantile. Alors que le lait maternel est riche en DHA synthétisé par la mère, les laits infantiles sont riches en précurseur ALA provenant des matières grasses végétales (MGV). Or la conversion de l'ALA vers le DHA n'est pas suffisante chez le nourrisson pour arriver aux taux de DHA dans les tissus équivalents aux taux des nourrissons allaités (référence). La disponibilité limitée et le coût important du DHA purifié pouvant être ajoutés aux formulations infantiles font qu'il devient important de comprendre comment intensifier la voie de conversion de l'ALA vers le DHA et comment augmenter l'assimilation du DHA dans les tissus, principalement dans le cerveau et la rétine.

Les laits infantiles sont principalement composés de MGV comme base lipidique et certaines études récentes ont montré que l'ajout partiel de matière grasse laitière (MGL) pourrait augmenter la quantité de DHA au niveau du cerveau des nourrissons (modèles rongeurs). Néanmoins, ces études diffèrent dans les régimes donnés aux animaux tant par la quantité d'ALA donnée aux mères ou aux rats, la proportion d'AGPI n-3 par rapport aux AGPI n-6, la durée de régime ou le moment de la vie où est donné le régime (gestation, lactation, post sevrage).

Le but de cette étude est donc de comprendre d'où provient l'effet observé avec la MGL sur l'augmentation du DHA au niveau du cerveau :

- une quantité d'ALA plus importante avec un régime MGL ?
- un ratio d'AGPI n-6 / n-3 différent entre les formulations MGL et MGV ?
- un stade de vie différent où le régime est procuré ?

Pour cela l'assimilation du DHA et la conversion du DHA à partir de l'ALA des animaux sera étudié avec une valeur fixe ou variable d'ALA dans les régimes en fonction de la base lipidique (MGV vs MGL), du stade de vie (gestation, lactation, post sevrage), du ratio AGPI n-6/n-3 (5 ou 10) et du sexe de la progéniture. La composition en acides gras du cerveau, du foie, de la rétine, du tissu adipeux, du plasma et des globules rouges sera étudiée chez 8 rats mâles et 8 rats femelles à la naissance (effet gestation), au sevrage (effet lactation) et 6 semaines après le sevrage. Les ratons proviendront de 3 lots de 5 mères soumis aux régimes en début de gestation :

- lot MGL, 2,3% d'ALA, ratio AGPI n-6/n-3 = 5
- lot MGV, 2,3% d'ALA, ratio AGPI n-6/n-3 = 5
- lot MGV, 1,7% d'ALA, ratio AGPI n-6/n-3 = 10

Les compositions des régimes miment la formulation lipidique de laits infantiles présents sur le marché.

Pour cela 18 mères en gestation et 144 ratons seront nécessaires. Les rates mettant bas en moyenne 11 petits, 198 ratons sont attendus au maximum. Les ratons surnuméraires seront utilisés pour l'étude de l'effet gestation ou pour compléter les lots au sevrage et 6 semaines après le sevrage dont le nombre minimum de rats par lot doit être de 8 par lot.

Ce projet se base sur la règle des 3R dans sa démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale.

Réduction : Le nombre d'animaux par lot est choisi et réduit au maximum pour permettre néanmoins une étude statistique suffisamment puissante des résultats. La gestion des ratons surnuméraires en étudiant l'effet gestation et en supplémentant les lots suivant permet d'éviter l'euthanasie inutile de ces ratons.

Raffinement : Par rapport à certaines études basées sur des régimes caricaturaux où les mères sont déprimées en AGPI n-3, les acides gras apportés par le régime dans notre étude sont à des doses qui restent physiologiques et qui miment la réalité nutritionnelle. Les quantités de litière sont augmentées par rapport à la normale pour permettre une nidification et réduire le stress des mères et des ratons. De plus, les animaux sont habitués à la contention une semaine avant la fin de l'expérimentation pour éviter le stress engendré par la piqûre de l'anesthésie, la seule procédure invasive de l'expérimentation.

Remplacement : Cette étude nutritionnelle nécessite un modèle *in vivo* car il n'existe pas à ce jour de modèle *in vitro* permettant de reproduire la complexité du métabolisme des acides gras avec une approche multi-organe.

11307 Notre plateforme d'imagerie est équipée d'un imageur optique pourvu d'une fonctionnalité imagerie par rayons X 2D dédié aux études précliniques.

Le principe de l'imagerie optique consiste à éclairer le corps avec une source lumineuse et à récupérer les photons qui sont réémis par les cellules, soit de manière naturelle, soit par l'injection d'agents de contraste fluorescents dans le corps. Cette technique d'imagerie présente de nombreux avantages pour les études précliniques :

- Elle est non invasive, non irradiante et sans contact pour l'animal. Un même animal peut ainsi être suivi longitudinalement réduisant le nombre d'animaux nécessaire.
- Elle se caractérise par une haute résolution spatiale et spectrale (grande spécificité) permettant d'avoir des informations fonctionnelles, morphologiques et/ou métaboliques plus précises par rapport à d'autres techniques d'imagerie.
- Temps d'acquisition des images très rapide ce qui limite le temps d'anesthésie des animaux.

L'imagerie par rayons X permet d'avoir une information anatomique rapide et précise notamment du squelette du rongeur. Ce repère anatomique permet de localiser spatialement, par superposition, la fluorescence.

De part ces avantages, de nombreuses équipes de recherche externes nous contactent pour réaliser des études par imagerie optique et par rayons X sur l'évolution et les modifications fonctionnelles, morphologiques et/ou métaboliques de leurs modèles murins ainsi que pour valider l'efficacité d'un traitement et/ou pour déterminer la biodistribution et suivre l'évolution de cellules marquées ou d'agents de contraste.

Dans ce contexte, ce projet a pour objectif de couvrir les expériences en imageries optiques et/ou par rayons X des équipes de recherche extérieures à notre établissement utilisateur qui auront déposé leur propre demande d'autorisation détaillant le nombre d'examen, leur fréquence ainsi que les concentrations et les volumes de produits injectés.

Le nombre d'animaux estimé pour ce projet durant 5 ans est de 5000 (80% de souris et 20% de rats). Ce nombre est probablement surestimé puisque l'imagerie peut être réalisée plusieurs fois sur un animal et permet ainsi son suivi. Le nombre d'animaux à inclure dans les études des équipes extérieures à la plateforme est donc réduit.

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

- Remplacement : le but de l'étude est de détecter et de suivre au cours du temps les modifications fonctionnelles, morphologiques et/ou métaboliques des organes ainsi, il est nécessaire d'utiliser des animaux.

- Raffinement : En dehors des acquisitions d'image, les animaux sont surveillés quotidiennement et ont accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Ils sont hébergés dans un environnement enrichi permettant la formation de groupes sociaux. Durant les examens, les animaux sont anesthésiés et installés dans une enceinte chauffée.

- Réduction : Le nombre d'animaux est réduit à son minimum puisque chaque animal peut être dans certain cas son propre témoin, cela permet de suivre l'évolution d'une pathologie. Un test statistique adapté est utilisé pour les petits effectifs.

11308 La sumoylation est une modification des protéines par un petit peptide, appelé SUMO, qui permet de moduler leurs fonctions dans la cellule. Ainsi, la sumoylation touche de nombreux aspects de la vie d'une cellule, et des travaux récents ont montré son importance dans des pathologies humaines à forte prévalence, telle que la maladie d'Alzheimer ou le cancer, maladies dont la complexité requiert le recours à des modèles animaux pour les étudier (la souris de laboratoire étant le modèle le plus approprié).

Des données générées au laboratoire indiquent un fort impact du processus de sumoylation sur le maintien de l'identité cellulaire via le contrôle de programmes transcriptionnels spécifiques à chaque type de cellule. Ainsi, il a été montré qu'une baisse de sumoylation semble favoriser les changements d'états cellulaires, démontrant un rôle de SUMO dans la plasticité cellulaire. Dans ce contexte, nous supposons que SUMO a un rôle dans la régénération tissulaire et souhaitons l'étudier au niveau du muscle squelettique.

En effet, le muscle squelettique présente un développement et une croissance prodigieuse et possède de grandes capacités régénératrices. Ces capacités de croissance et de régénération font de lui un organe très plastique. À l'origine de cette plasticité musculaire se trouve un réservoir de cellules souches, dont les plus étudiées à ce jour sont les cellules satellites qui, comme leur nom l'indique, se localisent en périphérie des fibres musculaires. Ces cellules sont mises en place au cours du développement. Le développement et le maintien de ces cellules est crucial à l'homéostasie et à la régénération musculaire.

Ce projet sera effectué dans le respect de la démarche 3R.

Ce projet vise à comprendre le rôle de la sumoylation lors du processus de régénération musculaire à la suite d'une blessure. Si certaines expériences d'analyse peuvent être établies *in vitro*, d'autres doivent impérativement être réalisées *in vivo* car aucun système *in vitro* ne permet à ce jour de

reproduire fidèlement les conditions naturelles et complexes d'un tissu. Le recours à l'animal est donc nécessaire pour cette étude.

Afin de limiter la douleur, des anesthésiques et des analgésiques sont utilisés pour toutes les procédures qui le requièrent.

Les animaux seront hébergés en groupe. Même si aucune souffrance n'est attendue durant l'expérience, les animaux seront surveillés soigneusement pour détecter d'éventuels signes de stress ou de souffrance et auquel cas intervenir rapidement.

Ce projet met en œuvre une procédure modérée qui nécessitera 810 souris âgées de 8 à 12 semaines, sur une durée de 5 ans.

Il s'agit du nombre de souris maximum qui sera utilisé pour obtenir des résultats significatifs (test Mann Whitney). Ce nombre d'animaux a été obtenu par un calcul de puissance statistique en collaboration avec un biostatisticien, et est basée sur le nombre minimum d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement robustes et reproductibles. Il pourra être réduit au vu des premiers résultats obtenus.

Le bénéfice attendu du projet est de déterminer le rôle de la sumoylation dans la régénération tissulaire, ce qui permettra une meilleure compréhension des processus normaux et pathologiques de la régénération musculaire et, à terme, d'établir de nouvelles thérapies pour ce type de pathologies.

11309 La migration, l'invasion et la capacité à former des métastases représentent des caractéristiques importantes dans l'agressivité des tumeurs. Nous avons récemment montré que la protéine IRE1 pouvait contrôler ces propriétés des cellules tumorales par deux mécanismes, l'un dépend de mécanismes transcriptionnels induits par IRE1 et l'autre de la capacité d'IRE1 à former des échafaudages moléculaires avec le cytosquelette d'actine, via la filamine A. Dans ce projet nous proposons de tester la contribution de ces deux mécanismes dans la migration/invasion et la formation de métastases dans deux types de cancers, le glioblastome et le mélanome. Pour ce faire, des modèles de souris immunocompétentes et immunodéficientes seront utilisés afin de tester l'altération des voies de signalisation IRE1 dans les cellules tumorales. Les animaux sont produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R. De notre côté nous veillons à bien définir le projet et sa pertinence comme le stipule la règle des 3R. En effet avant de réaliser les procédures des études de préliminaires seront réalisées afin de remplacer chaque fois que cela est possible le modèle *in vivo* par des modèles *in vitro*. A ce stade du projet, l'utilisation de modèles animaux reste inévitable puisqu'aucun modèle suffisamment précis n'est disponible pour étudier le mélanome et sa réponse aux traitements. L'efficacité d'un nouveau traitement passe nécessairement par ces études *in vivo* et l'intérêt d'avoir un modèle reproductible est essentiel pour bien appréhender l'efficacité de nouvelles molécules et ce dans le même environnement. Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable. Au total 800 souris au maximum seront nécessaires pour cette étude. Afin de raffiner les conditions de vie des souris, un suivi adapté des animaux sera instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, mais aussi la détresse ou l'angoisse qu'ils pourraient éprouver. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté. Pour cela des soins pré-, per- et postopératoires adéquats seront réalisés. Toutes les interventions seront réalisées sous anesthésie générale et des traitements analgésiques sont systématiquement utilisés pour prévenir toute douleur.

11310 La transformation maligne est associée à des dérèglements du métabolisme cellulaire. La mitochondrie est au centre de la régulation du métabolisme cellulaire énergétique, et une altération des fonctions mitochondriales joue un rôle dans le développement tumoral. Ainsi, interférer dans la fonction de la mitochondrie représente de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les

traitements anti-cancéreux. L'objectif est de comprendre les mécanismes moléculaires qui contrôlent la prolifération physiologique et tumorale de l'intestin.

Cette étude est réalisée sur 4 modèles de souris transgéniques porteuses de mutations constitutives ou inductibles par traitement médicamenteux afin de tester leurs implications dans le développement tumoral intestinal et dans la physiologie intestinale. L'usage exclusif de lignées cellulaires ne permettrait pas d'appréhender le tissu intestinal dans son ensemble. L'intestin est un organe complexe qui se renouvelle constamment, est composé de plusieurs types cellulaires et dont le métabolisme et le système immunitaire influencent énormément la tumorigenèse.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum permettant une analyse statistique efficace des résultats d'après nos données antérieures. Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera l'étude de 790 souris. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse des animaux, une surveillance trois fois par semaine des animaux sera réalisée en respectant des points limites bien définis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. L'utilisation de régime antioxydant dans les conditions de tumeurs du colon permettra de montrer les bienfaits de la réduction du stress oxydant sur la progression tumorale. Les greffes de moelle osseuse et les échographies rectales seront réalisées sous anesthésie générale gazeuse pour éviter toute douleur aux animaux.

A terme ce projet permettra de mieux caractériser le développement de cancers de l'intestin liés à des dérèglements métaboliques et de stress oxydant. Nous espérons identifier des acteurs moléculaires et des voies de signalisation capables de freiner ou stopper le développement du cancer colorectal (CRC).

11311 Trois virus apparentés : le virus de la dengue (sérotypes 1 à 4) (DENV), le virus Zika (ZIKV) et le virus de la fièvre jaune (YFV) sont responsables de centaines de milliers de cas de maladies humaines graves et de dizaines de milliers de décès chaque année. Actuellement, aucun vaccin approuvé pour l'utilisation chez l'homme n'est disponible pour le DENV et le ZIKV et la demande pour le vaccin contre le YFV dépasse l'offre, rendant les humains dans les zones endémiques vulnérables à cette maladie. L'objectif de ce projet est le développement d'un vaccin polyvalent capable de protéger les humains contre l'infection par ces trois virus.

La technologie du vecteur lentiviral (VL) qui sera utilisée pour développer ce vaccin présente un avantage important par rapport aux autres approches vaccinales traditionnelles. Ces vecteurs, non-réplicatifs et non-pathogènes, peuvent induire une réponse immunitaire cytotoxique capable de détruire des cellules infectées. La stimulation de ces cellules cytotoxiques peut être particulièrement importante pour le développement du vaccin contre le DENV, car il a été démontré que les anticorps produits contre un sérotype de ce virus non seulement ne protègent pas systématiquement les humains mais peuvent en plus augmenter la gravité de l'infection causée par d'autres sérotypes de DENV. A ce stade de développement du vaccin, le recours à l'animal est incontournable.

Dans ce projet, des régions ciblées des trois virus permettant une réponse immunitaire chez l'homme seront identifiées à partir de logiciels informatiques et de données publiées. Cela permettra de réduire le nombre de vaccins candidats à tester chez les animaux. Les antigènes définis seront produits sous la forme de VL et leur immunogénicité sera testée sur des lignées de souris sensibles à l'infection par le DENV, le ZIKV et le YFV. L'immunogénicité des VL sera également testée *in vitro* sur les cultures de cellules humaines afin de réduire le nombre de candidats vaccins à évaluer chez la souris. Sur la base de ces tests, les antigènes induisant de fortes réponses immunitaires contre chacun des trois virus seront choisis et utilisés pour déterminer le nombre et le calendrier des vaccinations dans 2 procédures de sévérité légère.

L'étape suivante sera de déterminer dans 2 procédures de classe modérée quelles souris sont infectables par les DENV et YFV et quelles sont les conditions d'infection les plus efficaces. Cette étape est nécessaire car peu de lignées de souris sont infectables par ces virus et les conditions d'infection peuvent être différentes selon les souches virales utilisées. Les conditions de l'infection par ZIKV sont connues et ont déjà été publiées.

L'efficacité de vaccins prophylactiques pour protéger des souris contre les infections par les DENV, ZIKV et YFV sera évaluée lors de 3 procédures de classe modérée. Si les souris sont protégées après chaque infection virale, un candidat vaccin trivalent comprenant les régions immunogènes de chaque vaccin candidat sera créé. La capacité de ce vaccin à protéger les souris contre l'infection pour les DENV, ZIKV et YFV sera testée dans trois procédures de classe modérée. Si les souris sont protégées par le candidat trivalent contre les trois infections virales peu de temps après la vaccination, une étude de protection à long terme sera réalisée.

Le nombre d'animaux à utiliser a été déterminé avec l'aide d'un biostatisticien et des tests statistiques de type ANOVA seront réalisés pour déterminer la significativité de nos résultats. La mise en place de points limites lors des infections virales nous permettra d'arrêter les expériences dès l'apparition de certains symptômes et ainsi limiter la souffrance des animaux.

Ce projet comporte 2 procédures légères (688 souris) et 8 procédures modérées (1444 souris), soit un total de 2132 souris sur une période de 5 ans.

11312 Le mélanome cutané est une tumeur maligne qui se développe à partir de cellules de la peau, les mélanocytes. Ces cellules fabriquent la mélanine, un pigment qui donne sa couleur à la peau et qui la protège du soleil. Le mélanome est un cancer fréquent avec plus de 11 000 nouveaux cas estimés en 2012 dans le monde. Dans les pays occidentaux, la fréquence du mélanome est multipliée par deux tous les dix ans depuis 50 ans.

Quand la tumeur est de faible épaisseur et qu'elle reste localisée à la peau, la chirurgie est le traitement de référence. Lorsque le mélanome se propage dans les ganglions et devient métastatique, les traitements disponibles sont l'immunothérapie et les thérapies ciblées. L'immunothérapie (IT) est un traitement qui entraîne l'organisme à détruire les cellules tumorales par ses propres défenses immunitaires. Les thérapies ciblées vont, quant à elles, empêcher le fonctionnement de protéines mutées qui favorisent le développement du cancer. Cependant ces traitements ne sont pas toujours efficaces, imposant la poursuite du développement de nouvelles stratégies de traitement.

Notre équipe développe une nouvelle approche de traitement du mélanome métastatique qui utilise la radiothérapie. Dans notre cas, la radioactivité n'est pas apportée par un appareil qui génère les rayons comme dans la radiothérapie classique externe, mais par une molécule, appelée ICF01012, qui contient de l'iode radioactif et qui se fixe spécifiquement sur la mélanine contenue dans le mélanome. Cette molécule peut être administrée sous forme de perfusion intraveineuse, on parle donc de radiothérapie interne vectorisée (RIV). Cette approche a déjà démontré son efficacité via le ralentissement de la croissance de la tumeur et du nombre de métastases, avec une toxicité acceptable chez des souris porteuses de mélanome.

Nous étudions actuellement l'impact de la RIV seule et associée à une immunothérapie, sur la réponse immunitaire antitumorale, en utilisant un modèle d'implantation de tumeurs en sous-cutané chez la souris. En effet, il est connu que la radiothérapie externe classique stimule la réponse immunitaire anti-tumorale. Nous avons montré que la RIV déclenchait une réponse similaire (données non publiées) notamment en recrutant des cellules immunitaires (tueuses mais aussi régulatrices) au niveau de la tumeur. Nous avons montré que la combinaison de la RIV à l'IT (un des traitements actuels du mélanome métastatique) présente un intérêt majeur : les effets sur l'immunité de la RIV accroissent considérablement l'efficacité de l'IT, notamment un certain type d'IT empêchant le fonctionnement des cellules régulatrices. Notre hypothèse est que cette efficacité pourrait être liée au recrutement par la tumeur de cellules régulatrices après la RIV.

Nous cherchons donc à démontrer cette hypothèse en utilisant des souris modifiées génétiquement qui, sous l'effet d'une toxine (injectée), n'ont pas de cellules T régulatrices. Nous comparerons lors d'une étude de survie l'efficacité d'ICF01012 chez ces souris en présence et en l'absence de cellules régulatrices (n=72).

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3R est de 72 souris sur 5 années.

Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée.

En effet, de nombreuses études *in vitro* réalisées en amont ont permis de remplacer l'utilisation des animaux. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer les effets potentiellement indésirables sur d'autres organes d'une nouvelle thérapie.

Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles.

La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques (Rimadyl 5mg/kg sous-cutané) avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

11313 La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative associée au vieillissement, constituant un problème de santé publique majeure dans le monde. Il n'y a actuellement aucun traitement efficace ni de moyen reconnu de prévention de cette maladie. L'identification de facteurs de risque alimentaire et la détermination de leurs mécanismes d'action, basés sur les relations intestin-cerveau à travers les barrières intestinale et hémato-encéphalique (BHE), sont un moyen de parvenir à une prévention. Une neuroinflammation créée par les oligomères de peptide β -amyloïde (A β O) qui sont les agents de la MA produits par l'hydrolyse de la protéine précurseur APP contribue aux dysfonctions des synapses cérébrales et aux pertes de mémoire, associée à cette pathologie.

L'acide arachidonique (ARA), deuxième acide gras le plus présent dans le cerveau après l'acide docosahexaénoïque (DHA) est apporté par la consommation de produits d'origine animale. Il est à l'origine de différents composés appelés eicosanoïdes qui sont impliqués dans l'inflammation. Une consommation excessive d'ARA est susceptible de créer un état subinflammatoire chronique qui pourrait faciliter l'induction d'une neuroinflammation par les A β O. Par ailleurs, l'obésité constitue un facteur de risque de la MA et s'accompagne d'un état subinflammatoire lié en partie à des modifications des populations bactériennes intestinales (dont l'ensemble est appelé le microbiote intestinale) qui entraînerait une activation des cellules du système immunitaire, le signal pro-inflammatoire étant transmis à travers la barrière intestinale puis la BHE. Dans un contexte alimentaire associant un régime obésogène de type hyperlipidémique et une consommation excessive d'ARA, un état subinflammatoire pourrait survenir et contribuer à faciliter l'induction d'une neuroinflammation par les A β O.

Le présent projet s'appuie sur cette hypothèse de travail et aura pour objectif de mesurer l'effet de régime alimentaire riche en ARA associé ou non à un régime riche en lipides sur 1) la composition du microbiote, 2) l'état subinflammatoire périphérique et central, 3) l'intégrité de la BHE et 4) la sensibilité à la neurotoxicité des A β O chez la souris mâle adulte Balb/c. En terme de conséquence pour l'homme, ce projet permettra de déterminer si la consommation d'ARA associée ou non à un régime hyperlipidémique peut faciliter la survenue de la MA. Cela montrerait la nécessité d'évaluer la part de l'ARA et de l'excès de lipides dans notre alimentation et influencerait les recommandations des agences en charge de la nutrition humaine. De plus, l'identification d'altération du microbiote permettrait de rechercher des moyens correctifs comme par exemple l'apport de probiotiques. Enfin, la mise en évidence d'un état subinflammatoire et l'altération éventuelle de la BHE permettrait de mieux comprendre les communications entre l'intestin et le cerveau, possiblement transposable à d'autres pathologies.

Ce travail nécessite le recours à l'animal entier, seul niveau d'organisation permettant d'évaluer les effets négatifs des régimes alimentaires sur la MA, il ne peut être substitué par des méthodes alternatives (Remplacement).

L'étude comprendra quatre lots d'animaux. Un premier lot de 120 animaux servira à déterminer si l'apport alimentaire d'ARA dans un contexte d'alimentation standard ou hyperlipidémique pendant 12 semaines entraîne une inflammation détectable au niveau sanguin et/ou cérébral ainsi que des

modifications du microbiote. De plus, il permettra d'appréhender les pertes de mémoire dans notre modèle expérimental d'Alzheimer. A 10 semaines de régime, les animaux de ce lot seront soumis à des injections intracérébrales soit de solutions saline ou d'A β Os. Les animaux subiront des prélèvements de sang puis seront mis à mort et leur cerveau prélevé à différents temps de manière à préciser la cinétique des modifications de paramètres inflammatoires et du microbiote. Un second lot de 40 animaux permettra d'évaluer si ces mêmes contextes d'alimentation affectent l'intégrité de la BHE. Après 12 semaines de régime, les animaux seront mis à mort et leur cerveau prélevé pour étudier les modifications au niveau de la BHE. Un troisième lot de 240 animaux sera soumis après 10 semaines de régime associant ou non un apport d'ARA à un régime standard ou hyperlipidémique à des injections intracérébrales soit de solution saline ou d'A β Os. Puis les capacités de mémoire seront testées durant les deux semaines suivantes avant l'euthanasie des animaux et prélèvements des tissus intestinaux, hépatiques et cérébraux pour analyser les paramètres inflammatoires et déceler une surcharge lipidique, une atteinte des synapses et de la BHE. Enfin un dernier lot de 40 souris servira à entraîner les expérimentateurs à l'injection intracérébrale des différentes solutions pour minimiser les pertes d'animaux et mettre au point les analyses portant sur la BHE. Au total, le projet utilisera 440 souris.

Les injections intracrâniennes seront pratiquées avec des traitements antidouleurs avant et après injection de manière à réduire la douleur des animaux (Raffinement). En cas de dépassement de l'un des points limites définis (arrêt de prises de nourriture ou de boisson, diarrhée, perte de poids excessive, émission de vocalises, pilo-érection, prostration, diminution de l'activité motrice et de la réactivité aux stimuli extérieurs, respiration excessive, absence de toilettage), les animaux seront exclus de l'étude et euthanasiés en conformité avec les recommandations éthiques.

Le nombre d'animaux a été fixé à minima en tenant compte des différents types d'analyses, de l'exploitation statistiques des données comportementales, de la validité et de l'interprétation scientifique des résultats (Réduction). Les expérimentations seront effectuées selon la réglementation et les recommandations en vigueur en termes de bien-être et de limitation de l'inconfort et de la douleur (Raffinement) de manière à garantir la qualité des résultats.

11314 Les maladies infectieuses sont parmi les principales causes de mortalité dans le monde. Nous étudions le processus infectieux induit par la bactérie pathogène *Listeria monocytogenes*. Cette bactérie est responsable de la listériose, une maladie qui affecte de nombreuses espèces animales et dont le taux de mortalité peut atteindre 30% chez l'homme. La transmission de la maladie se fait généralement par l'alimentation. *L. monocytogenes* est maintenant l'un des pathogènes intracellulaires les mieux caractérisés. Les facteurs de virulence majeurs de *Listeria* et leurs ligands cellulaires ont été identifiés, ce qui a permis de découvrir des voies de signalisation complexes qui dérivent de leur interaction et d'améliorer la connaissance de la biologie du cycle intracellulaire de la bactérie et des mécanismes de résistance aux défenses de l'hôte. *Listeria* est maintenant utilisée comme un microorganisme modèle pour comprendre la biologie de l'infection pour trouver de nouveaux moyens de lutter contre les maladies infectieuses affectant l'homme.

De nombreux aspects de l'infection restent obscurs et notre projet vise à les caractériser, notamment par l'identification de nouveaux facteurs et mécanismes de virulence dans le modèle d'infection de la souris de laboratoire. Ce modèle animal classique pour l'étude de la listériose permet l'étude conjointe des facteurs bactériens et des facteurs de l'hôte. Une grande partie de nos recherches visant à comprendre le rôle des facteurs bactériens ou des facteurs de l'hôte dans l'infection sont réalisées sur des cultures cellulaires *in vitro*, évitant ainsi le recours à l'animal. Cependant, pour comprendre le développement de la pathologie à l'échelle de l'organisme, et en particulier la mise en place des défenses immunitaires de l'hôte dans les tissus, l'expérimentation animale est indispensable. Nous limitons cependant les études *in vivo* aux seuls facteurs pour lesquels nos études préalables indiquent un rôle dans l'infection. Ce projet nécessitera 3 procédures de sévérité modérée et l'utilisation de 1560 souris sur 5 ans. Le suivi de l'infection par imagerie non invasive permettra également de réduire le nombre de souris nécessaire à l'étude et d'anticiper les points-limites. Des points-limites pouvant être facilement surveillés ont été établis afin d'interrompre l'expérimentation en cas de souffrance importante des animaux. Le bien-être des souris sera pris

en compte depuis la phase d'acclimatation jusqu'à la phase expérimentale pendant laquelle une visite quotidienne permettra une gestion de la douleur suivant des critères bien définis. L'état de l'animal sera évalué et s'il se détériorait progressivement sans retour à la normale jusqu'à conduire à la prostration, le hérissément des poils et la perte de poids supérieure à 20%, les animaux concernés seraient mis à mort de manière anticipée pour éviter d'atteindre des niveaux significatifs de souffrance et/ou de détresse.

Les tests statistiques ont été choisis avec un biostatisticien. La variable primaire sur laquelle sera appliqué un test statistique est la numération bactérienne, mesurée par unité formant colonie (UFC). 2 groupes de souches sont considérés, pour lesquels on réalisera la comparaison suivante : souche sauvage vs mutant. 2 groupes de souris sont considérés pour lesquels on réalisera la comparaison suivante : lignée sauvage vs lignée invalidée.

11315 Le nombre croissant de cas de maladie du foie gras ou stéatohépatite non-alcoolique (NASH), est étroitement corrélé à la pandémie de diabète. Mais aujourd'hui, aucun traitement n'existe pour soigner cette maladie du foie gras et les traitements anti-diabétiques restent lourds pour les patients. De ce fait, l'importance de développer des modèles animaux permettant de reproduire cette maladie du foie ainsi que le diabète permettront d'identifier et de tester plus facilement des nouvelles molécules thérapeutiques.

Basé sur les résultats et les protocoles de plusieurs études scientifiques, ce projet visera à induire la maladie du foie gras et/ou du diabète chez des souris ou des rats par des agents chimiques ou par un régime alimentaire particulier. Ces modèles animaux, qui sont très couramment utilisés par la communauté scientifique, seront alors utilisés afin de tester de nouvelles molécules thérapeutiques.

Durant toutes nos procédures d'expérimentations animales (induction de la pathologie + traitements), le principe des 3R est suivie de la façon suivante :

-Réduire : Basé sur notre expérience et les données publiés dans la littérature, un nombre minimal d'animaux (souris et rats) sera utilisé afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour nos conclusions. Un nombre estimé à 7450 souris et 2000 rats sera utilisé lors de ces 5 prochaines années. Ces chiffres sont basés sur nos expériences passées avec ces modèles.

-Remplacement : les observations physiologiques obtenues lors de nos expérimentations ne peuvent être réalisées sur d'autres modèles expérimentaux (in-vitro ou ex-vivo), car elles prennent en compte l'organisme dans son ensemble et les relations inter-organes (foie, pancréas, tissu adipeux, reins). Cependant, une revue précise de la littérature sur d'autres systèmes est réalisée avant et après chaque expérimentation.

-Raffinement : Les procédures décrites dans ce projet ne devraient pas engendrer de douleurs particulières aux animaux. Des seringues et aiguilles spécifiques aux volumes administrés et à l'espèce traitée seront utilisés afin de réduire au maximum le stress ou douleurs potentielles pendant l'injection. Tous nos animaux sont hébergés dans des cages aux dimensions et enrichissement en accord avec la législation européenne et en nombre adapté à l'espèce. Pendant toute la durée de nos études, les animaux sont suivis quotidiennement et pesés au moins une fois par semaine afin d'identifier au plus tôt un état clinique anormal. Tout signe clinique est répertorié (tel que perte de poids, défaut de toilettage, agressivité, immobilité,..) et une procédure en relation avec l'état clinique (détaillé plus bas) est mise en œuvre afin de diminuer la souffrance des animaux. Si l'allègement de la souffrance n'est pas observé, l'animal sera exclu de l'étude et euthanasié.

11316 Les études montrent que les infections par le virus de la grippe sont associées à une diminution du risque de cancer (comprenant tous les types de cancer et de mélanome sauf le cancer du sein). Des données expérimentales ont également montré que, *in vivo*, l'infection par le virus de la grippe stimule les réponses immunitaires des cellules B et T et retarde la croissance tumorale. Cependant, le mécanisme de protection reste inconnu. Nous avons observé que chez l'homme l'infection par le virus de la grippe conduit les plaquettes sanguines vers des éléments immunitaires tueurs face à des cellules tumorales *in vitro*. Notre projet a pour objectifs de mettre en place un modèle murin afin

de reproduire les résultats observés chez l'homme, de mieux comprendre l'activité cytotoxique des plaquettes, de définir les mécanismes permettant à une plaquette de devenir fortement cytotoxique face à des cellules cancéreuses et de proposer de nouvelles interventions thérapeutiques contre le cancer. Une injection de cellules tumorales (lignée AT3) dans une glande mammaire sera faite sur souris anesthésiée, puis le virus influenza sera inoculé en intranasale. L'isolation des plaquettes sera réalisée chez des souris contrôles puis injectées sur la tumeur de la souris visible au niveau de la glande mammaire. Les souris seront pesées chaque jour et le développement de la tumeur sera surveillé. Les souris seront sacrifiées 15 jours après injection des plaquettes mais en cas d'apparition de signe de souffrance précoces, les souris seront euthanasiées avant. Les poumons seront récupérés et mis dans du formol pour faire par la suite de l'immunohistologie.

Nous mettons tout en œuvre pour respecter la règle des 3R : Réduction, Raffinement, Remplacement, en n'utilisant que la quantité minimale de souris pour avoir au final des résultats statistiquement satisfaisants. Les règles éthiques sont toujours respectées au cours de notre protocole et nous veillons à surveiller les points limites que nous nous sommes fixés. Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 648 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre des animaux a été calculé en se référant à nos travaux antérieurs de manière à faire en sorte d'utiliser un nombre d'animaux minimum tout en ayant des statistiques significatifs (réduction). En ce qui concerne le remplacement, nous avons déjà réalisés des tests *in vitro* qui sont encourageants (étude de la cytotoxicité des plaquettes *in vitro*). Il est nécessaire maintenant de passer à un modèle animal qui permet de mieux comprendre les effets des molécules bioactives *in vivo* et il n'est pas possible de recréer cela d'une autre manière en utilisant la souris. En ce qui concerne le raffinement, les souris sont placées dans des conditions optimales (température 23°C, cycle jour nuit 12h/12h, enrichissement des cages à l'aide de coton de nidification) au sein d'une animalerie agréée. Les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum* et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale.

11317 Les cancers font partie des maladies les plus complexes à traiter. Parmi les différents types de cancer, ceux dits solides comme les cancers pancréatiques et pulmonaires sont très agressifs, ils répondent peu aux traitements actuels et de nombreuses rechutes sont observées. Il est donc nécessaire aujourd'hui de tester de nouvelles thérapies anti-tumorales dans des systèmes *in vivo*, qui contrairement au système *in vitro*, reflètent de façon plus précise les réponses attendues chez les malades.

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

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

Notre schéma expérimental consistera dans un premier temps à faire pousser des tumeurs humaines de type hématologique ou solide dans des souris immunodéficientes via 2 procédures différentes, en inoculant des cellules tumorales par voie sous-cutanée ou intra-pancréatique. Après la croissance des tumeurs, les souris seront soit sacrifiées de façon à récupérer les tumeurs et à pouvoir tester l'efficacité des CAR T *ex vivo* grâce à des techniques d'imagerie, soit maintenues en vie de façon à être traités avec les mêmes cellules. Ces expériences permettront à la fois d'expliquer le mécanisme d'action des CAR T, de comparer ces résultats à ceux obtenus *in vitro* au préalable

mais également de tester directement leur efficacité à traiter des souris porteuses de ces tumeurs. Cette étude nécessitera un total de 600 souris pour une période totale de 5 ans.

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

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

11318 L'alimentation néonatale (allaitement maternel ou préparation pour nourrisson) a des effets à long terme sur la santé de l'adulte. Ainsi, l'allaitement maternel serait-il protecteur vis à vis de pathologies comme l'obésité. Cependant, l'allaitement maternel n'est pas toujours possible et améliorer la qualité des préparations pour nourrissons pour que celles-ci permettent un développement des nouveau-nés le plus proche possible de celui des nouveau-nés allaités par leur mère reste donc une priorité en terme de nutrition néonatale. A cette fin, il est nécessaire de comprendre les différences physiologiques engendrées par le type d'alimentation. Le présent projet a pour objectif d'évaluer l'impact de l'alimentation néonatale sur le comportement alimentaire et le développement de tissus (cerveau et intestin) du porcelet Yucatan au sevrage, utilisé comme modèle du nouveau-né humain.

Pour cela, deux groupes de 16 porcelets seront constitués : 1 groupe de porcelets allaités par leur mère de la naissance au sevrage à 28 jours d'âge et 1 groupe de porcelets nourris avec une préparation pour nourrisson (de composition permettant de couvrir les besoins énergétiques du porcelet) de la naissance au sevrage à 28 jours d'âge. Au sevrage, l'ensemble des porcelets sera placé en cages individuelles afin d'évaluer leurs préférences alimentaires (aliment peu sucré versus riche en sucre). Les animaux seront ensuite soumis à un test de stratégie alimentaire (choix entre une petite quantité d'aliment riche en sucre versus une grande quantité d'aliment peu sucré) dans un parc de test dédié. L'ensemble de ces données de comportement sera complété par une analyse des tissus clés en termes de régulation du comportement, à savoir certaines zones cérébrales et l'intestin, tissus prélevés sur les porcelets après euthanasie.

Ce projet se conforme à la règle des 3R. Remplacer : l'objectif de ce projet est d'évaluer les conséquences de la nutrition néonatale sur le comportement alimentaire et de mettre ces données en regard de données moléculaires et physiologiques qui seront obtenues sur les tissus de ces mêmes animaux (cerveau et intestin). Ces études de physiologie ne peuvent pas être appréhendées dans des modèles cellulaires qui ne rendent pas compte de la complexité des interactions entre les organes. Nous ne disposons pas non plus d'outils bio-informatiques de modélisation de ces fonctions. Pour ces raisons, le recours à des animaux est nécessaire. Réduire : le nombre d'animaux nécessaire a été calculé à partir de données de la littérature ou de données internes afin d'obtenir la puissance statistique nécessaire pour mettre en évidence des différences significatives entre les deux groupes d'animaux et de prendre en compte un pourcentage d'animaux qui refuseraient de se soumettre aux tests. Raffinement : les procédures de ce projet impliquent un élevage des animaux en cages individuelles afin d'une part de les nourrir avec une préparation pour nourrisson jusqu'au sevrage (la moitié des animaux) puis d'observer leurs comportements alimentaires après le sevrage (ensemble des animaux). Pour réduire le stress lié à l'isolement, un enrichissement du milieu sera proposé et les contacts visuels et sonores entre porcelets seront maintenus. Des observations quotidiennes de l'état général des animaux (état corporel, troubles digestifs, respiratoires et locomoteurs ainsi que les blessures) seront réalisées tout au long de

l'expérimentation. Les plaies et blessures seront traitées par application d'antiseptique. Les autres événements (boiterie, inflammation, diarrhées) seront traités par une médication appropriée. Les animaux ainsi traités seront exclus du dispositif expérimental. En cas de complications sévères, le personnel animalier est autorisé à pratiquer une euthanasie immédiate afin de prévenir la douleur chez ces animaux.

11319 Les travaux qui seront entrepris dans le cadre de ce projet visent à permettre l'étude de différents paramètres physiologiques chez la souris vivante au cours du développement ou à l'âge adulte. Notamment ce protocole permettra d'étudier le développement de populations de neurones au cours de la gestation chez l'embryon, de mesurer l'activité électrique des neurones du cerveau chez la souris adulte éveillée et se déplaçant librement dans sa cage, permettre la stimulation ou l'inhibition sélective de certaines populations de neurones du cerveau et d'en déterminer les effets sur le comportement et la physiologie des animaux, et la mesure en continue de paramètres physiologiques tels que les concentrations de glucose dans le sang ou le cerveau. Les souches de souris utilisées sont les C57Bl6, B6D2 et FVB (cf. tableaux pdf en document attaché où la répartition de l'utilisation des animaux est maintenant détaillée dans le tableau pdf joint en annexes par espèce, génotype et grands types d'expériences) et le nombre total d'animaux utilisés durant la validité du protocole sera de 500 souris ; les souches de rats seront les Sprague Dawley et Wistar et le nombre d'animaux utilisé sera de 50 rats. La nature de notre recherche qui vise à explorer des processus physiologiques et physiopathologiques de grandes fonctions telles que la reproduction, la régulation de l'équilibre énergétique et la cognition limitent sérieusement la possibilité de REMPLACER les animaux utilisés (par exemple, le remplacement des modèles animaux par des systèmes cellulaires ou de tissus n'est pas envisageable). Cependant, la mise en œuvre des axes de recherche énoncés dans ce projet vont permettre de collecter de manière répétée de nombreuses données chez un même animal et donc d'augmenter la puissance statistique de nos résultats, ce qui nous permettra de REDUIRE le nombre d'animaux utilisés. De plus, une attention particulière a été accordée au principe de RAFFINEMENT, en améliorant par exemple les différentes procédures expérimentales à appliquer aux animaux, afin de minimiser l'inconfort ou les souffrances inutiles qu'ils pourraient endurer au cours des manipulations expérimentales (utilisation d'anesthésie/analgésie, définition de points limites...).

11320 Ce programme porte sur l'évaluation de l'efficacité et la sûreté d'utilisation de la thérapie génique synthétique, une approche thérapeutique non-virale, non-intégratif pour le traitement des pathologies humaines simples et complexes. La thérapie génique synthétique repose sur l'utilisation d'ADN double-brin non-viral et non-infectieux produit de manière synthétique. Cet ADN thérapeutique comporte une ARN polymérase ADN dépendante synthétique, ainsi que dans la même molécule d'ADN le ou gènes sous contrôle de cette ARN polymérase. Dans les versions prototypes de ce protocole, l'ADN utilisé sera circulaire et non conjugué, alors que dans sa version finale, il sera linéaire et conjugué. Les performances de ce système de thérapie génique synthétique ont été testées avec de très bons résultats chez le rat Sprague Dawley dans le cadre du programme EUK-LPR (Eukarys Liver ProRegeneration).

Le programme décrit ici porte sur le développement d'EUK-WIL (Eukarys Wilson disease) – le second traitement de thérapie génique synthétique – lui-même destiné au traitement des complications aiguës de la maladie de Wilson. Cette maladie génique autosomale récessive est déterminée par la mutation du transporteur du cuivre d'ATP7B. Elle est caractérisée par l'accumulation toxique de cuivre dans le foie et le système nerveux central, responsable de complications aiguës et chroniques. Bien que différents chélateurs du cuivre constituent un traitement efficace, il persiste d'importants besoins médicaux pour le traitement des complications aiguës (hépatites aiguës, hémolyse intravasculaire) et des phases de décompensation induites par l'introduction des chélateurs du cuivre.

Les études décrites dans ce document visent à l'évaluation de l'efficacité et de la tolérance d'EUK-WIL chez les rats LEC (Long Evans Cinnamon) porteurs d'une mutation spontanée du gène ATP7B homologue, responsable d'un phénotype proche de celui de la maladie humaine. Après sélection

de la dose, l'efficacité d'EUK-WIL sera étudiée selon deux modalités : une étude de prévention chez des animaux asymptomatiques, suivie d'une étude curative chez des animaux présentant une hépatite aigue Wilsonienne.

Les études seront réalisées de manière séquentielle avec analyse des résultats pas-à-pas de manière à éviter l'euthanasie inutile d'animaux. Les phases exploratoires pourront être interrompues prématurément en cas de mauvaise efficacité ou tolérance du traitement. Un total de 160 rats LEC sera ainsi étudié, ces effectifs étant calculés comme minimum pour permettre d'évaluer une différence statistiquement significative entre les groupes. Dans le but d'éviter l'euthanasie inutile d'animaux, chaque groupe sera divisé en deux, la moitié des animaux étant initialement testée, puis si aucun effet indésirable majeur n'est observé la seconde moitié du groupe.

Le présent protocole a été conçu pour être en accord avec la réglementation des 3R. Les animaux seront stabulés dans un environnement enrichi pour limiter le stress. La souffrance des animaux sera réduite par suivi régulier par un personnel compétent, des critères d'interruption étant prédéfinis en cas de souffrance de l'animal qui imposerait son euthanasie. Enfin, les rats seront stabulés dans un environnement contrôlé (température : $22 \pm 2^\circ\text{C}$; humidité relative : $55 \pm 15\%$; cycle lumière/obscurité de 12 heures). Les animaux seront gardés à cinq par cage selon les normes en vigueur. Ils recevront une alimentation standardisée et de l'eau ad-libitum. L'eau de boisson sera supplémentée en cuivre (CuCl_2 20 mg/L à partir du sevrage). Le département est équipé d'un système d'assainissement de l'air par filtration sur charbon activé qui permet un renouvellement de 10 fois par heure le volume d'air. La souffrance des animaux sera réduite par une prise en charge de la douleur et anesthésie appropriée en cas d'injection ou prélèvements intraveineux. Des critères d'interruption sont définis en cas de souffrance de l'animal estimé selon un protocole prédéfini.

Au total, le programme présenté ici constitue les phases toutes initiales de R&D de développement d'EUK-WIL, un traitement de thérapie génique synthétique non-viral, non-infectieux et non-intégré pour le traitement des complications aiguës de la maladie de Wilson, une maladie génétique présentant d'importants besoins médicaux non-résolus.

11321 La latéralité est la prévalence d'un côté du corps sur l'autre, que ce soit pour percevoir et traiter des informations ou pour produire des comportements. Elle existe chez quasiment toutes les espèces animales étudiées jusqu'à maintenant, des invertébrés comme les abeilles aux vertébrés comme les humains. La latéralité peut s'exprimer à l'échelle individuelle (auquel cas chaque individu peut avoir une préférence pour le côté droit ou pour le côté gauche, sans que cette préférence soit nécessairement la même que celle de ses congénères) ou bien à l'échelle de la population (auquel cas la majorité des individus montrent une préférence pour le même côté). L'exemple le plus frappant de latéralité à l'échelle de la population est la latéralité manuelle chez les êtres humains : plus de 90% des personnes montrent une préférence pour la main droite. Plusieurs hypothèses existent pour expliquer pourquoi les individus sont latéralisés, parfois majoritairement dans le même sens. Etre latéralisé à l'échelle individuelle permettrait aux individus d'être plus performants en améliorant leur vitesse de réaction et en évitant d'éventuels conflits entre les deux côtés du corps ou du cerveau. A l'échelle de la population, certains pensent que l'alignement des préférences des individus pour un même côté permettrait une meilleure coordination et une meilleure synchronisation de ces individus et assurerait donc une meilleure cohésion des groupes constitués de tels individus. Elle serait donc apparue préférentiellement chez les espèces sociales, espèces chez lesquelles la coordination et la cohésion des individus est indispensable au bon fonctionnement du groupe. Des études ont montré que les espèces sociales de poissons sont effectivement plus souvent latéralisées à l'échelle de la population que les espèces solitaires. Une autre étude a montré une latéralisation chez une espèce d'abeilles sociales mais pas chez une espèce d'abeilles solitaires. D'autres études suggèrent un lien entre comportement social et latéralité. Néanmoins, un lien direct entre latéralité et socialité reste à démontrer, notamment à l'échelle individuelle. Est-ce que des individus fortement latéralisés sont plus coordonnés et montrent une meilleure cohésion que des individus non ou peu latéralisés ? C'est à cette question que nous souhaitons répondre en étudiant la latéralité chez deux espèces d'oiseaux montrant différents niveaux de latéralisation : la caille japonaise et la poule domestique. Ces deux espèces

ne sont pas latéralisée avec la même force et à la même échelle ce qui en fait de bons modèles pour voir si une latéralisation plus forte ou plus importante est liée à des comportements mieux coordonnés et à une meilleure cohésion. Nous utiliserons 15 cailles japonaises, 260 cailleteaux, 12 poules Pékin et 180 poussins. Nous estimons que ce nombre est le minimum requis pour obtenir une puissance statistique suffisante (principe de réduction). L'étude repose sur l'observation comportementale des animaux. Nous ne pouvons donc pas éviter l'utilisation d'animaux vivants (principe de remplacement). Aucune pratique invasive n'est requise dans le cadre du projet et un suivi journalier permettra de veiller au bon état de santé des animaux tout au long de l'expérimentation (principe de raffinement).

11322 A partir du 1 janvier 2019, le passage à une alimentation 100% bio représentera un défi important pour les fabricants d'aliments car les besoins en acides aminés (AA) du porc devront être couverts seulement en combinant au mieux les ressources « bio » riches en protéines afin d'éviter des carences préjudiciables aux performances. En pratique, cela demande de connaître très finement la valeur protéique des matières premières riches en protéines (MPRP) biologiques. A ce jour, les MPRP bio disponibles sont principalement les tourteaux de soja, de tournesol (et dans une moins mesure le tourteau de colza) mais également les différentes variétés de pois (protéagineux et fourragers) ou des fourrages. Pour ces différentes matières premières, les teneurs en AA digestibles ne sont pas connues et/ou demandent à être précisées pour prendre en compte les spécificités (conditions agronomiques de production, procédés de trituration, etc.) imposées par la filière Bio. L'objectif de cet essai est d'étudier les valeurs protéiques et énergétiques de produits issus de la luzerne pour le porc en croissance.

La valeur protéique sera mesurée dans un dispositif comprenant concernant au total 6 porcs de 35-40 kg en début d'expérience. 4 régimes contenant respectivement 0, 25% de luzerne enrubannée, 25% de farine de feuilles de luzerne et 25 % d'ensilage de feuilles de luzerne seront utilisés. Les régimes obtenus seront testés dans un dispositif de type carré-latin complet. Enfin d'expérience, les animaux recevront un régime dépourvu de protéines pour évaluer les pertes endogènes. Pour chaque période de mesure, les animaux seront collectés pendant 3 jours après 4 jours d'adaptation aux régimes.

La valeur énergétique de l'enrubanné de luzerne sera mesurée sur 10 porcs. 5 porcs recevront un régime témoin et 5 porcs recevront le régime témoin + 25% de luzerne sous forme enrubannée. Les animaux seront collectés pendant 7 jours après 14 jours d'adaptation aux régimes.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de déterminer l'utilisation digestive des acides aminés et de l'énergie et il n'est pas possible d'étudier l'utilisation digestive des nutriments autrement que sur un animal entier et vivant. Raffinement : Pour la mesure de la digestibilité des acides aminés, la chirurgie est la seule méthode permettant de collecter quantitativement les digestats de la fin de l'intestin grêle. Elle est mise en place sous anesthésie générale et une analgésie est appliquée pendant l'intervention et au cours de la période post-opératoire avec un suivi très attentif des animaux pendant toute la durée de l'expérience. Réduction : le nombre d'animaux (n=6 pour la digestibilité iléale + 10 pour la digestibilité fécale) et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour l'intégration des résultats du projet dans des tables de composition nutritionnelle tout en limitant le nombre d'animaux et la durée d'hébergement dans des cages à digestibilité.

11323 La croissance musculaire nécessite l'activation et la différenciation des cellules souches musculaires aussi appelées cellules satellites. Chez les poissons, les cellules satellites maintiennent des capacités de prolifération qui permettent la formation continue de fibres musculaires (hyperplasie) pendant la croissance post-larvaire. Néanmoins, la croissance musculaire hyperplasique diminue avec l'âge et les mécanismes cellulaires ne sont pas encore connus. Notre objectif est de déterminer si les capacités myogéniques des cellules souches musculaires s'altèrent avec le temps. Pour cela nous souhaitons réaliser des transplantations de cellules souches musculaires issues de truites de différents âges (100g-2kg) et exprimant une

protéine fluorescente (GFP), dans le muscle de truites également de différents âges (100g-2kg). Nous quantifierons ensuite le nombre de nouvelles fibres exprimant la GFP comme rapporteur des capacités myogéniques des cellules souches.

Cette expérimentation a été conçue en intégrant la règle des 3R :

Remplacement : La transplantation de cellules souches dans le muscle est la seule méthode qui permet d'évaluer précisément les capacités myogéniques des cellules *in vivo* car elle intègre l'impact de l'environnement cellulaire et tissulaire.

Réduction : Nous réaliserons dans un premier temps une cinétique de prélèvement à l'aide de 30 poissons. Nous choisirons ensuite les 2 temps optimaux pour réaliser nos prélèvements (7 poissons) au cours de dix expériences (140 poissons) avec des animaux d'âge différents (100g-2kg).

Raffinement : La transplantation se fait par une injection intramusculaire des cellules souches extraites. Des expériences passées ont montré que cela entraînait une cicatrisation très rapide, sans effet délétère sur la croissance et aucune mortalité. Les manipulations sont réalisées le plus rapidement possible pour limiter le stress. Les poissons seront anesthésiés avant l'injection des cellules et remis dans l'eau pour récupérer dès que l'injection est terminée.

11324 Ce projet vise à explorer la façon dont les primates peuvent effectuer une discrimination parmi leurs partenaires sexuels après copulation. Cette discrimination étant basée sur des caractéristiques génétiques de leur partenaire La sélection du partenaire par les femelles a certainement été un élément majeur de sélection au cours de l'évolution humaine. Au cours de l'évolution humaine et des primates non-humains, le dimorphisme sexuel a dû restreindre le rôle de sélection directe exercée par les femelles. Cependant, alors que de nombreux mécanismes théoriques concernant des choix cryptiques réalisées par la femelle ont été proposés, aucun élément permet de le prouver. Cette étude vise à explorer expérimentalement les mécanismes par lesquels les babouins s'engagent dans une discrimination post-copulatoire, ce qui représente un modèle intéressant pour l'évolution humaine du fait du haut degré de compétition directe (dimorphisme sexuel) et indirecte inter-mâles (larges testicules). Cette étude sera conduite sur des groupes de babouins olives en semi-liberté. Les femelles seront entraînées à présenter leur arrière train pour la réalisation de frottis vaginaux permettant d'étudier l'environnement vaginal suite à des accouplements avec des mâles de génotypes différents.

Nous nous attendons à ce que le pH vaginal, le cuivre et le système immunitaire soient modifiés en lien avec l'accouplement et le contact avec du sperme provenant de mâles ayant un niveau élevé d'hétérozygotie, et des différences importantes concernant le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité).

L'étude permettra aussi d'explorer la communication socio-sexuelle et le comportement des individus en lien avec leur génotype. La réponse immunitaire sera mesurée par la séquence d'ARN et des modèles mixtes linéaires seront utilisés pour déterminer les facteurs prédictifs de l'environnement vaginal liés à l'accouplement.

Ce projet permettra d'étudier les processus physiologiques associés au choix post-copulatoire et de permettre une meilleure compréhension du choix des femelles lors de l'accouplement, mécanisme majeur présente tout au long de l'évolution humaine.

Le projet sera conduit sur le modèle babouin olive (*Papio anubis*). 22 individus (15 femelles et 7 mâles) seront impliqués dans le projet pour analyses génétiques (prélèvement sanguin) et observations et collecte de données comportementales. Les individus seront hébergés en groupes sociaux multi sexes : 1 mâle et 2 à 3 femelles. Les individus seront entraînés à volontairement coopérer pour la collecte de données (prélèvement de sperme et frottis vaginaux) limitant ainsi grandement le stress des individus.

L'échantillon est réduit à son maximum tout en maintenant un pouvoir statistique nécessaire à l'analyse des données.

11325 Les agonistes bêta2-adrenergiques de longue durée d'action (LABA) sont de puissants bronchodilatateurs utilisés dans le traitement de l'asthme. Une étude multicentrique a confirmé un risque augmenté d'évènements indésirables sévères chez les patients asthmatiques traités par LABA. Un lien direct entre LABA et développement d'une hyperréactivité et d'un remodelage bronchiques a été proposé. D'autre part, nous avons identifié récemment une nouvelle famille de protéines adaptatrices du récepteur bêta2 adrénergique, la protéine GASP-1 (Protein-Coupled Receptor Associated Sorting Protein 1). Son rôle potentiel dans la survenue d'effets indésirables des LABAs sera étudié grâce à une souris chez laquelle le gène *gasp-1* a été invalidé puis confirmé par l'utilisation d'inhibiteurs de l'interaction entre GASP-1 et le récepteur beta2 adrénergique.

Ainsi, l'objectif de cette étude est dans un premier temps de mettre au point chez la souris un modèle chronique d'administration de LABA (formotérol) pour valider la création d'une hyperréactivité bronchique (HRB), ainsi qu'une modification de la tolérance aux effets bronchodilatateurs du LABA. Dans un deuxième temps, nous étudierons le rôle de la protéine adaptatrice GASP-1 dans la survenue des effets indésirables associés au traitement chronique aux LABAs, ouvrant ainsi de nouvelles potentialités thérapeutiques pour lutter contre les effets délétères des LABAs, en particulier dans l'asthme sévère.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons la souris, car il a été mis en évidence que l'administration chronique des agonistes bêta2-adrenergiques chez cette espèce pourrait induire une HRB. A ce jour, aucun modèle alternatif n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre d'étudier ces effets indésirables. Pour cette raison, une approche *in vivo* est nécessaire pour étudier le rôle de la protéine GASP-1 dans la survenue des effets indésirables associés au traitement chronique aux LABAs.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes de 3 à 5, dans des grandes cages enrichies de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, de la nourriture et de l'état des animaux.

La douleur liée aux administrations est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal pour visualiser tout signe d'inconfort imprévu qui nécessiterait l'arrêt de la procédure expérimentale.

Réduire

La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles.

Nous avons montré de par notre expérience antérieure que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet d'obtenir un modèle reproductible avec 12 souris par groupe.

Nous envisageons donc l'utilisation de 888 souris sur une période de 5 ans.

11326 Titre du projet : Validation et caractérisation de nouveaux gènes impliqués dans les myopathies congénitales

Durée du projet : 5 ans

Mots-clés : muscle, myopathies, AAV, génétique, souris

Notre projet de recherche translationnelle et appliquée concerne les maladies musculaires humaines d'origine génétique (myopathies congénitales).

Son but est de valider et de caractériser des nouveaux gènes impliqués dans les myopathies congénitales.

Les résultats auront un impact direct pour le diagnostic moléculaire des patients atteints de myopathies congénitales, pour leur prise en charge, et ouvriront de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Afin de mener à bien ce projet, nous prévoyons d'utiliser 15 souris / groupe pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Un maximum de 720 souris sera utilisé.

Nous prévoyons d'utiliser des souris non génétiquement modifiées. Ces souris seront modifiées par injection de vecteurs viraux (AAV) pour reproduire une situation similaire à celle retrouvée chez les patients. Les animaux seront susceptibles de développer des pathologies d'ordre musculaire. Ils seront surveillés quotidiennement pour vérifier qu'ils ne souffrent pas et qu'ils sont capables de se mouvoir. Les animaux seront tous sortis de l'étude à l'issue du projet ou auparavant en cas d'application de point limite éthique afin de respecter le bien-être animal.

Nous avons utilisé des cultures cellulaires et des biopsies musculaires de patients pour étudier les mécanismes moléculaires à l'origine des myopathies. L'utilisation de souris est maintenant indispensable pour valider l'impact des mutations et comprendre la physiopathologie *in vivo*. Ainsi, les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris et de mieux comprendre leur développement (REMPACEMENT).

Plusieurs procédures expérimentales (maximum une /jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris. De plus, les souris seront analysées *in vivo* / *in situ* / *in vitro* et les tissus seront prélevés post-mortem pour des expériences ultérieures éventuelles. D'autre part, le test de puissance statistique permettra d'assurer à posteriori et pour l'avenir l'échantillonnage minimal nécessaire à une différence significative dans le cadre de ces expériences. (REDUCTION)

Les myopathies sont des maladies entraînant un défaut de la structure du muscle. Etant donné que la structure du muscle murin est similaire à la structure du muscle humain, la souris est un modèle très adapté pour l'étude des myopathies. Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, elles seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT).

11327 L'augmentation des émissions atmosphériques de CO₂ et leur absorption par les océans entraînent une baisse du pH des eaux marines. Cette acidification des océans est de nature à perturber le fonctionnement des écosystèmes marins et à mettre en péril les espèces qui les occupent. En dépit de leur importance économique, écologique et patrimoniale, il existe très peu d'études ayant traité du cas des poissons. Pourtant, évaluer la capacité des poissons à répondre à l'acidification des océans est capital, non seulement parce que ces organismes représentent une composante majeure des écosystèmes auquel ils appartiennent, mais aussi parce qu'ils sont indispensables à la prospérité et à l'alimentation des populations humaines.

L'un des effets de l'acidification les plus marqués sur la physiologie des poissons semble concerner les aspects neurologiques. En effet, des études antérieures menées sur des espèces de poissons tropicaux ont montré que l'acidification provoquait des troubles de la perception et du comportement. Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons étudier chez le bar européen (*Dicentrarchus labrax*) l'effet de l'acidification sur l'interaction sociale, sur la réponse au prédateur et, d'une manière plus générale, sur la capacité de l'animal à percevoir son environnement.

Ainsi, deux groupes d'animaux seront comparés (n=72 poissons au total) :

- Un groupe de poissons "Contrôle", élevés dans des conditions de pH actuel (pH 8.2).
- Un groupe de poissons "Acidification", élevés dans les conditions de pH prévues par le "scénario à 100 ans" le plus alarmant du GIEC (pH 7.6).

Ces animaux ont été élevés, depuis le stade "Œuf" jusqu'au stade juvénile (masse d'environ 150g aujourd'hui) dans leurs conditions de pH respectives.

Trois procédures sont envisagées dans le cadre de ce projet :

1) L'identification des animaux par marquage, consistant à implanter sous la peau des animaux anesthésiés des puces à usage vétérinaire.

2) Une analyse du comportement des animaux : dans un 1er temps, le comportement d'un individu placé seul dans l'arène expérimentale sera étudié. Un miroir sera fixé sur l'un des côtés de l'arène de telle façon que l'animal sera en mesure d'y apercevoir son reflet. Durant 2 heures, il sera laissé libre d'interagir avec son image, perçue comme un congénère et donc à priori attractive pour le sujet contrôle. Nous chercherons alors à déterminer dans quelle mesure l'acidification modifie l'interaction entre un individu et son reflet (=congénère). Dans un 2nd temps, le même individu sera placé dans la situation où il doit faire face à un prédateur. Ainsi, un oiseau factice sera soudainement lancé au-dessus de l'arène et la réaction du sujet sera étudiée durant 1 heure. A travers ce protocole expérimental, nous souhaitons analyser l'effet de l'acidification sur la perception d'un danger par l'animal ainsi que sur la réaction mise en place pour y échapper.

3) Une procédure de respirométrie : la 1ère étape de la procédure consistera à mesurer, durant 48h, les consommations d'oxygène d'individus "Contrôle" et "Acidification", calmes et au repos, placés individuellement dans les chambres de respirométrie. Les poissons "Acidification" étant, selon la littérature, moins anxieux que les poissons « Contrôle », il est probable qu'ils parviennent à se calmer plus aisément dans les chambres de respirométrie et qu'ils présentent des consommations d'oxygène plus faibles que les poissons "Contrôle". La 2ème étape de la procédure consistera à mesurer, durant 48h supplémentaires, la consommation d'oxygène des mêmes individus, calmes et au repos, mais cette fois placés en groupe de 2 dans les respiromètres. L'objectif est en effet de potentiellement mettre en évidence (i) chez les sujets "Contrôle", un effet apaisant de la présence du congénère et (ii) chez les sujets "Acidification", un appauvrissement du lien social.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R :

- les procédures envisagées seront conduites en répondant aux exigences de Réduction (utilisation d'un nombre d'animaux correspondant au minimum requis pour s'assurer de la robustesse de nos analyses statistiques)
- les procédures envisagées seront conduites en répondant aux exigences de Raffinement (tout sera mis en œuvre pour limiter l'anxiété et la souffrance des animaux).
- Le remplacement du modèle animal ne pourra pas être fait (Remplacer) dans la mesure où les processus étudiés s'appliquent à l'organisme vivant, dans son intégrité et toute sa complexité.

11328 L'obésité est un problème de santé publique dont l'incidence est de 15% en France, soit environ 6 millions de citoyens. L'obésité est une maladie mortelle et ampute l'espérance de vie de 20 ans suite aux complications induites (diabète, hypertension artérielle, cancer, dyslipidémie etc...).

Le traitement médical et les règles hygiéno-diététiques sont inefficaces et seul le traitement chirurgical est efficace à long terme. Environ 60 000 procédures de chirurgie de l'obésité (gastrectomie en gouttière ou sleeve-gastrectomie ; gastric bypass, duodenal switch, anneau) sont réalisées par an en France et sont à l'origine de 2 à 10% de complications et de 0,5 à 2% de décès. La complication la plus redoutée est la fistule digestive (fuite du liquide digestif au niveau des sutures digestives) qui est à l'origine d'infections de la cavité abdominale et expose au risque de décès dans 30% des cas s'il n'y a pas de traitement réalisé en urgence.

La fuite digestive (fistule) se voit dans 2% des cas et son traitement est long et nécessite plusieurs mois d'hospitalisation avec de nombreuses interventions endoscopiques et chirurgicales et de nombreux examens radiologiques et ne permet le tarissement de la fuite que dans 40% des cas.

Nous souhaitons la réalisation d'un modèle de fistule digestive gastrique chirurgicale chez le rat Zucker obèse de sexe mâle de 9 à 10 semaines pour évaluer une technique visant à améliorer la cicatrisation de l'estomac après chirurgie.

Notre étude nécessite 72 rats Zucker. Tous nos rats seront mis dans des cages à raison de 3 animaux par cage, nourriture et boissons *ad libitum*. Les cages seront enrichies par l'addition de

petites maisons rouges à double entrée permettant aux rats de se cacher et fuir en cas d'agression, des petits morceaux de papier seront également ajoutés afin de leur permettre de créer des nids.

Tous les rats seront endormis par un anesthésiant au masque et bénéficieront d'antalgiques et antibiotiques et d'un suivi post-opératoire quotidien (samedi, dimanche et jours fériés compris) à l'animalerie à l'aide d'une grille de score, et l'euthanasie des animaux si les points limites sont atteints.

Nous utiliserons 12 rats pour la mise au point du modèle chirurgical avec la création d'une sleeve gastrectomy et d'une fistule (fuite) de 2mm de diamètre au sommet de l'estomac et une reprise chirurgicale 6 heures après pour le traitement de cette fistule par toilette péritonéale et drainage au contact. Nous procéderons à l'euthanasie de 3 rats par semaine pour prélèvement gastrique et évaluation de la cicatrisation de l'orifice fistulaire par examen anatomo-pathologique. Notre étude consiste ensuite à réaliser cette procédure chez 48 rats Zucker que nous diviserons en deux groupes, un groupe témoin de 24 rats qui bénéficiera du traitement habituel (toilette de la cavité abdominale et la mise en place d'un drain au contact de la fuite gastrique) et un groupe test de 24 rats qui bénéficiera en plus du traitement habituel, de la mise en place d'un mélange de plasma riche en plaquettes (PRP) et de cellules souches mésenchymateuses (CSM) au niveau de l'orifice fistuleux (le PRP potentialise l'effet des CSM). Toutes les semaines, nous procéderons à l'euthanasie de 25% des rats de chaque groupe témoin et test et nous prélèverons leur estomac afin de comparer l'évolution de la cicatrisation dans chaque groupe. L'objectif de ce travail est d'évaluer les bénéfices de la thérapie cellulaire dans la cicatrisation des fistules digestives post-chirurgie bariatrique.

Les prélèvements de sang pour extraire le PRP et les prélèvements de moëlle osseuse pour extraire les cellules souches seront réalisés chez un troisième groupe de 12 rats qui seront euthanasiés préalablement.

Ce modèle ne peut pas être mimé *in vitro* et l'évaluation de la cicatrisation ne peut être réalisée que par l'euthanasie de l'animal et l'étude anatomo-pathologique de l'estomac.

Pour la réduction du nombre de rats utilisés, nous avons calculé les effectifs par un test statistique de Fischer, et nous avons réalisé une large recherche bibliographique afin de nous assurer la non duplication des protocoles expérimentaux déjà réalisés.

11329 L'arthrose et les neuropathies sont des maladies chroniques présentant un fort impact sur la qualité de vie des patients. Il est très fréquent, dans ces pathologies, que la mobilité soit fortement diminuée entraînant des conséquences dans la vie personnelle et professionnelle des patients ainsi qu'un coût économique important pour la société. La prise en charge médicamenteuse de ces maladies est à terme souvent d'une efficacité relative et peut présenter des effets indésirables importants. Il est donc indispensable de trouver des nouvelles stratégies thérapeutiques pour la prise en charge de ces deux pathologies.

Deux stratégies sont actuellement évaluées afin de contrecarrer les difficultés de mouvements liées aux pathologies étudiées. La première est le blocage d'un canal calcique qui est une protéine impliquée dans la transmission et la perception du message nerveux. La seconde est l'inhibition de l'angiogenèse qui est un phénomène retrouvé au niveau articulaire (création de nouveaux vaisseaux sanguins) lors d'une arthrose et qui participe à cette pathologie.

Afin de pouvoir proposer de telles stratégies en clinique, la preuve d'une potentielle efficacité est nécessaire en pré-clinique.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer sur les paramètres locomoteurs (1) le blocage du canal calcique dans un contexte neuropathique et arthrosique et (2) l'inhibition de l'angiogenèse dans un contexte arthrosique.

Pour répondre à cet objectif des souris et rats, mâles et femelles seront utilisés. Le nombre total d'animaux prévu est de 936. Ce nombre a fait l'objet d'une évaluation précise décrite la partie technique en prenant en compte le bien-être animal et les impératifs scientifiques/statistiques liés

au projet. Les animaux seront surveillés quotidiennement. Si leur état général se dégrade, des mesures correctrices seront mises en places par les soigneurs.

Notre projet suit au mieux la règle des « 3R ». Le remplacement par des méthodes alternatives n'est pas possible car l'étude de la locomotion n'est possible que dans un modèle vivant intégré possédant un système nerveux développé. Dans une logique de réduction du nombre d'animaux utilisés, ce nombre a été calculé en réalisant une étude bibliographique approfondie pour ne pas effectuer des expériences en double ainsi que par une méthodologie rigoureuse et des calculs statistiques appropriés. De plus, la marche des animaux sera évaluée à différents temps sur un même animal afin de réduire le nombre d'animaux par expérimentations. Enfin, une stratégie séquentielle sera utilisée : si les résultats sont négatifs pour une expérimentation clé alors les expérimentations qui en découlent ne seront pas réalisées. Le raffinement reposera tout d'abord sur un hébergement et une surveillance renforcée ainsi que sur l'élaboration de protocoles prenant en compte au maximum le bien-être animal.

11330 L'expérimentation animale s'effectue dans un cadre réglementaire national. Les personnes ayant suivi une formation initiale réglementaire (formations niveau A ou B), doivent valider leurs compétences pour la réalisation des gestes techniques nécessaires à leur pratique expérimentale. Le présent projet concerne deux formations courtes, pratiques, et encadrées par du personnel zootechnique qualifié, que notre établissement organise pour l'apprentissage de gestes techniques simples sur la souris : contention, injection intrapéritonéale, lecture de l'identification individuelle lors de la formation 1, et prise de sang lors de la formation 2. Ces formations ont pour but d'apporter et valider des compétences appliquées à du personnel nouvellement impliqué en expérimentation animale ou bien pour lequel il est nécessaire de réapprendre ces gestes.

Ce programme est mis en place avec la Structure du Bien-Etre Animal et le Responsable du suivi des compétences de l'établissement, et assurera durablement sécurité et bien-être à la fois des souris et des expérimentateurs. La qualité des gestes alors maîtrisés garantira également la qualité des résultats expérimentaux qui seront générés dans les projets ultérieurs.

Nous avons estimé à 30 et 10 personnes à former respectivement à la formation 1 et 2, soit 1000 souris pour 5 ans. Ces souris seront des animaux réformés, à phénotype non dommageable, provenant des élevages de l'établissement et ne seront pas produits à cette fin.

L'apprentissage de ces gestes ne peut être réalisé qu'en condition réelle sur animal vivant. Afin de garantir le minimum d'inconfort chez la souris, l'apprentissage sera graduel : après une première phase d'apprentissage sur documents (films et schémas), la contention se fera tout d'abord sur individus connus pour être calmes, puis sur individus plus vifs. La contention devra être maîtrisée avant de passer à la pratique des autres gestes. De même, l'apprentissage de l'injection IP se fera au départ avec seringue sans aiguille. La validation de la qualité de l'injection sera validée grâce à un colorant vital après euthanasie de l'animal. Les personnes ayant validé ces compétences pourront si nécessaire suivre la séance dédiée à l'apprentissage des techniques de prélèvement sanguin. Pour certaines de ces techniques, une anesthésie sera réalisée pour le confort de l'animal. A la fin de ces sessions, les animaux seront euthanasiés afin d'apprendre également ces gestes opératoires. Certains gestes ici ne sont pas des procédures au sens réglementaire et ne nécessitent alors pas de demande d'autorisation. Cependant, elles sont citées ici afin de permettre une meilleure compréhension du programme de formation. La validation de ces formations sera inscrite dans les livrets de compétence des participants.

11331 Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes en France, comme dans l'Union européenne. En 2015, on dénombrait 11913 décès dû à cette maladie, soit 18,2% des décès par cancer chez la femme (source : Les cancers en France, édition 2016, Institut National du Cancer). Le cancer du sein est associé au développement d'une tumeur de la glande mammaire. En effet, les cellules épithéliales de la glande mammaire prolifèrent de manière anormale et demeurent dans le sein (on parle alors de cancer in situ) ou se détachent pour migrer vers d'autres organes (le cancer est dit, dans ce cas, infiltrant).

Un objectif majeur de la recherche entreprise ces dernières années consiste à comprendre pourquoi certaines tumeurs résistent aux traitements ou récidivent plusieurs années après avoir été traitées. L'identification des « cellules souches cancéreuses » au sein des tumeurs du sein (et d'autres organes) a permis de comprendre en partie ces phénomènes. En effet, les cellules constituant les tumeurs ne sont pas homogènes : il existe une hiérarchie cellulaire au sommet de laquelle se situent les cellules souches cancéreuses. Ces cellules sont capables d'initier la formation d'une tumeur et sont particulièrement résistantes aux chimiothérapies.

Les cellules souches cancéreuses partagent, comme leur nom le suggère, certaines propriétés des cellules souches. Ces dernières sont capables, dans la glande mammaire normale, de se différencier pour donner différents types de cellules épithéliales de la glande mammaire. Le maintien d'une réserve de cellules souches dépend de facteurs de croissance, de la matrice extracellulaire et également de facteurs pro-inflammatoires. Ces différents facteurs sont produits par les cellules stromales, qui constituent le microenvironnement de la tumeur.

Ce projet a pour but d'étudier la contribution des cellules stromales au développement normal et tumoral de la glande mammaire. Les cellules stromales sont une source de facteurs permettant le maintien d'une réserve de cellules souches, mais également de cellules souches cancéreuses. A moyen terme, ce projet vise à identifier des nouvelles cibles thérapeutiques pour diminuer la résistance et la récurrence aux traitements du cancer du sein.

Ce projet repose sur le recours à des souris de laboratoire consanguines dont le patrimoine génétique a été modifié afin de visualiser et d'étudier au niveau moléculaire les cellules stromales. La complexité du microenvironnement tumoral ne permet pas, à ce jour, une approche expérimentale de remplacement *in vitro*. La souris est un bon modèle pour étudier ces questions car de nombreux outils existent et permettent d'étudier en détail les mécanismes biologiques. Le nombre de souris nécessaires à ce projet a été réduit au maximum.

Pour les trois procédures qui seront mises en œuvre dans ce projet, nous estimons à 1116 (sur 5 ans), le nombre de souris nécessaires, en nous limitant aux seules expériences et répétitions indispensables pour atteindre des résultats significatifs. Nous utiliserons des souris femelles pré-pubères et adultes. Tout au long du projet, nous donnerons la préférence aux procédures non invasives lorsque c'est possible et nous aurons recours aux soins/analgésiques nécessaires pour limiter la douleur et l'inconfort. Les niveaux de sévérité attendus liés à nos procédures sont modérés, cependant toutes les précautions seront prises pour limiter toute souffrance et inconfort potentiel. Pour nous en assurer, nous effectuerons un suivi régulier. En cas de signe de souffrance manifeste, les animaux seront euthanasiés selon les bonnes pratiques en expérimentation animale.

11332 L'audition nous permet, non seulement d'identifier et de localiser les sources sonores dans l'environnement, mais elle est également primordiale pour notre communication dans la société. A ce titre, la perte de l'audition peut rapidement placer la personne en situation de handicap (sensoriel comme social). En outre la surdité est le déficit sensoriel le plus fréquent chez l'Homme et touche plus de 280 millions de personnes dans le monde. En France, un enfant sur 700 naît avec une surdité sévère ou profonde, et un enfant sur 1000 deviendra malentendant avant l'âge adulte. Aujourd'hui, on estime qu'environ 80% des cas de surdité neurosensorielle ont une cause génétique. Cependant, il n'existe aucun traitement curatif des surdités neurosensorielles. A ce jour les approches cliniques utilisées pour pallier les déficits auditifs chez l'Homme sont l'utilisation d'amplificateur de son, dans le cas des surdités légères, et la pose chirurgicale d'un implant cochléaire pour les surdités sévères ou profondes. Ces traitements sont loin d'être parfaits, en particulier dans des environnements bruyants. Ainsi l'une des alternatives envisageables est la thérapie génique, cette technique vise à remplacer ou modifier un gène défectueux pour restaurer l'expression de la protéine déficiente. Bien que les progrès de la thérapie génique aient ouvert de nouvelles perspectives pour le traitement de nombreuses maladies, le succès dans le traitement de la surdité est resté inaccessible. Depuis près de 20 ans, des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension des surdités héréditaires congénitales. Ces progrès s'appuient en grande partie sur la production et l'étude de modèles murins mimant fidèlement des formes de surdité humaine. En effet, la complexité de l'anatomie et la structure de l'organe de l'audition n'ont pas

permis, à ce jour, d'établir un modèle *in vitro* dans lequel on pourrait étudier la physiopathologie des surdités. En revanche pour réduire le nombre de souris utilisées, l'expression de la totalité des gènes thérapeutiques, utilisés dans le cadre de ce projet, a été testée *in-vitro* sur des lignées cellulaires (Hela ou MDCK). Les objectifs de ce projet de recherche sont d'utiliser la thérapie génique à différents stades du développement afin de :

1. restaurer l'audition et/ou l'équilibre chez des souris établies comme modèles de surdités et troubles vestibulaires humains.
2. déterminer l'implication potentielle de la protéine SNAP25 (Synaptosomal-associated protein 25) dans la transmission du signal par les cellules sensorielles auditives.
3. d'établir une preuve de concept montrant l'efficacité de l'édition du génome (CRISPR-Cas) *in vivo* pour corriger les mutations ponctuelles responsables de surdité chez l'Homme.

Nous injecterons des virus porteurs d'une version normale des gènes mutés dans ces modèles murins. Ces injections seront réalisées à différents stades du développement pour déterminer le stade de développement pour obtenir une correction optimale.

Les résultats de ces études permettront non seulement une analyse détaillée de la physiologie moléculaire de l'audition, mais ouvriront également la voie à de nouvelles approches thérapeutiques dont le but de rétablir l'audition chez des patients atteints de surdité héréditaire.

Quatre procédures expérimentales seront utilisées : les injections *in utero* d'un point de vue de la femelle gestante et d'un point de vue de l'embryon, l'injection postnatale chez les souriceaux et la création de la lignée SNAP25 flox/flox Pmyosine15-Cre.

Les procédures sont de degré de sévérité léger pour la création de la lignée SNAP25 flox/flox Pmyosine15-Cre et pour l'injection chez l'embryon. Les procédures sont de degré de sévérité modéré pour la femelle gestante et l'injection chez les souriceaux. Les procédures sont de courte durée et n'entraînent pas de douleur chronique, la douleur est réduite par l'utilisation d'antalgiques. Ces procédures ne comportent aucune restriction par rapport aux conditions habituelles d'hébergement. Ce projet concerne 9 modèles murins de surdité et/ou troubles vestibulaires humains et il impliquera un total de 4635 souris sur une durée de 5 ans. Les souris mâles et femelles seront utilisées sans distinction après génotypage. L'estimation du nombre de souris a été déterminée pour permettre la détection d'une différence de 10% minimum entre les cellules et/ou les souris traitées et les souris non traitées. Les tests statistiques seront choisis en fonction des paramètres comparés (ANOVA, test de Mann et Whitney et/ou du test de Student).

Les souris utilisées dans ce projet seront élevées et hébergées dans les conditions optimales. Tous les efforts seront déployés pour s'assurer que l'inconfort, la détresse et la douleur soient réduits au minimum. Des traitements analgésiques et antalgiques seront mis en œuvre et adaptés à l'âge des animaux en pré- et post-opératoire pour obtenir une analgésie optimale pour chaque procédure. Un coton est placé dans chaque cage pour permettre aux souris de nidifier. Les souris gestantes seront placées dans des cages isolées après la procédure pour permettre un rétablissement dans un environnement calme. Un gel buvable et de la nourriture humidifiée seront placés sur la litière de leur cage pour permettre aux souris d'accéder à la nourriture sans créer de tension sur les sutures. En outre une « maisonnette pour souris » sera placée dans leur cage pour enrichir leur environnement. L'état de santé des souris sera suivi régulièrement pendant une semaine après la procédure (changements de posture, yeux plissés, manque de toilettage).

11333 Le diagnostic de maladies infectieuses repose sur différents critères : signes cliniques, radiologiques, facteurs de risque associés... et sur les résultats de tests biologiques. L'utilité des tests biologiques est d'autant plus grande que certaines infections présentent peu ou pas de signes cliniques caractéristiques. Un large panel de tests biologiques existe de la culture de prélèvements à la recherche d'anticorps spécifiques dans le sang des patients. Cette recherche d'anticorps spécifiques est dans de nombreuses maladies infectieuses le seul moyen de diagnostiquer et secondairement de traiter certaines maladies.

C'est dans ce but que nous développons des tests diagnostiques de maladies pour l'Homme et/ou les animaux, et que notre laboratoire collabore avec une entreprise. Nous avons mis au point des

tests fiables, spécifiques et sensibles de recherche d'anticorps de pathogènes parasitaires comme *Toxoplasma gondii* responsables de maladies graves et parfois mortelles chez l'homme. L'utilisation d'antigènes est la clé de voute de la mise au point de test de recherche d'anticorps. En l'absence d'alternative de bonne qualité, l'obtention de tels antigènes passe par l'expérimentation animale. Suite à l'injection d'agents infectieux, l'animal va développer et produire une ascite en 3 à 7 jours. Ces ascites de faible volume (< 1 ml) sont constituées exclusivement de *Toxoplasma gondii* et de quelques cellules immunitaires. Après lavage et purification, ces ascites permettront de produire des antigènes de grande qualité pour développer des tests sérologiques permettant de faire le diagnostic de patient infecté.

Concernant la toxoplasmose, nous avons déjà développé et commercialisé 3 tests. Les 2 premiers correspondent à la technique sérologique de référence (diagnostic de toxoplasmose congénitale, toxoplasmose oculaire, confirmation titre limite) commercialisé depuis plusieurs années. La troisième technique a été développée récemment et la commercialisation a été lancée en janvier 2015. Le volume de test commercialisé (en lien avec cette collaboration) est en pleine croissance et est lié aux redevances que perçoit notre laboratoire (multipliées par 6 en 3 ans). De plus, la société avec laquelle nous travaillons a pour projet de proposer cette dernière technique sur le marché international alors qu'il est restreint au marché européen pour l'instant. Ces informations justifient la volumétrie importante d'animaux à utiliser pour les années à venir pour ce protocole (maximum de 1680 animaux par an, 8400 animaux en 5 ans). L'objectif du projet est de disposer d'antigènes spécifiques et complets de pathogènes infectant l'Homme et/ou l'animal en situation *in vivo*. L'utilisation d'animaux est donc indispensable pour obtenir ces antigènes spécifiques.

Nos différentes expérimentations suivront le même schéma expérimental. Des souris, 50 à 200 par lot en fonction des besoins de production de tests diagnostiques, seront infectées par voie péritonéale (souche RH). Un maximum de 40 lots en 5 ans (1600 par an, 8000 animaux en 5 ans) sera utilisé dans ce protocole. Pour le redémarrage de la souche *in vivo* (mois avant production) un maximum de 10 animaux supplémentaires par lot sera utilisé (soit un total maximum de 400 souris sur 5 ans).

La seule manipulation réalisée sur l'animal vivant correspondra à l'inoculation inaugurale par voie intrapéritonéale. Cette inoculation sera faite afin d'éviter au maximum le stress et la douleur des animaux. Ces animaux seront suivis 2 fois par jour durant les 3 jours d'expérimentation. En effet, chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (anesthésie/analgésie si besoin). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 10) ; dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "*ad libitum*" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

11334 Le bleu de méthylène le plus récent sur le marché, est un composé proposé dans le cas de méthémoglobinémie. Il est commercialisé sous la forme d'une solution injectable. Les travaux réalisés par notre unité ont permis de montrer l'efficacité du bleu de méthylène dans un modèle de paludisme murin simple ou sévère (neuropaludisme). L'objectif du projet est d'estimer le meilleur rapport entre le temps d'utilisation et la dose la plus faible possible tout en gardant la plus grande efficacité contre les formes simples et sévères de paludisme murin. Cette démarche vise ainsi à limiter la quantité de produit absorbé.

La contrainte de résistances aux antipaludiques, nous impose d'associer le bleu de méthylène avec des antipaludiques reconnus et pour lesquels la résistance n'est pas actuellement caractérisée. Cela permet d'agir sur deux mécanismes supposés indépendants et différents l'un de l'autre.

Trois procédures expérimentales sont prévues afin de mener à bien ce projet, en prenant en compte la règle des 3R :

I) déterminer la meilleure posologie curative antipaludique en variant temps de traitement et doses reçues.

II) déterminer les associations efficaces en combinant le bleu de méthylène successivement avec quatre autres composés actifs.

III) Bloquer la transmission hôte – vecteur et réciproquement

L'efficacité d'un médicament sur un agent infectieux nécessite par définition, un organisme vivant et entier. Cela est d'autant plus pertinent afin d'observer la protection conférée par le traitement vis-à-vis de cet agent infectieux dont les atteintes sont multi-viscérales. En accord avec le principe de réduction des effectifs, les effectifs de souris seront calculés par rapport aux lois statistiques de survie dans ce modèle. Les organes tissus seront prélevés après la mort afin de réaliser des études complémentaires. La récupération des échantillons biologiques permet également de limiter les expériences complémentaires ultérieures avec de nouveaux animaux vivants. Le remplacement par une méthode alternative n'est pas viable et les études *in vitro* ont déjà été menées au préalable avec des résultats concluants. Le choix du modèle murin C57BL6 repose sur notre maîtrise complète du modèle, en tant que rongeur infecté ou non et des outils nécessaires à son évaluation. C'est un modèle largement utilisé en pharmacothérapie antipaludique. Le nombre de souris a été évalué à 176 femelles matures pour l'expérience.

Quant aux dommages escomptés ils se placent au niveau du modèle et des expérimentations, il faudra infecter des animaux avec une souche létale.

En Afrique et l'état sauvage, le parasite *Plasmodium berghei* infecte des petits rongeurs grâce son vecteur local. En raison de sa capacité à infecter les rongeurs *P. berghei* est un organisme modèle populaire pour l'étude du paludisme humain.

L'administration du bleu de méthylène entraînera un bleuissement des souris. En accord avec le principe de raffinement, les éventuels signes de souffrance seront systématiquement recherchés et évalués. Une attention particulière sera portée à l'enrichissement des rongeurs, de manière à limiter l'anxiété des animaux. Des abris, des morceaux de cartons et des éléments à ronger seront placés dans les cages et les souris seront habituées à la manipulation.

11335 L'hyperplasie bénigne de la prostate (ou HBP) est une tumeur bénigne de la prostate qui touche un homme sur deux à l'âge de 50 ans, et sa prévalence augmente encore en vieillissant. Cette pathologie altère le confort de vie des patients (troubles urinaires notamment). Outre l'ablation chirurgicale de l'adénome, qui conduit à des effets secondaires gênants chez de nombreux patients (troubles sexuels), les thérapies actuelles visent essentiellement à traiter les symptômes, et n'ont qu'une efficacité limitée. Le stress oxydant au sein du tissu prostatique est suspecté participer à la progression de la pathologie. Cibler ce phénomène biologique apparaît donc comme une piste prometteuse pour traiter l'HBP.

L'objectif de la présente étude est de tester l'efficacité d'un composé anti-oxydant dans un modèle de souris présentant une HBP. Le composé d'intérêt ayant un mécanisme d'action spécifique supposé plus efficace que celui des anti-oxydants classiques, son efficacité sur l'HBP sera comparée à celle d'un anti-oxydant classique. Les deux molécules impliquées dans notre étude sont déjà utilisées chez l'homme pour traiter d'autres pathologies que l'HBP. Ceci garantit l'absence de toxicité et accélérera leur mise sur le marché pour l'indication HBP en cas de résultats probants de notre étude.

La pathologie HBP impliquant des interactions entre plusieurs types cellulaires, l'efficacité de molécules thérapeutiques ne peut pas s'évaluer *in vitro*, mais requiert l'utilisation d'un modèle animal. Il existe un modèle de souris transgéniques présentant une HBP dont les caractéristiques sont semblables à celles observées chez l'homme, mais dont le phénotype n'est pas dommageable. Ce modèle sera donc utilisé pour tester l'effet du composé anti-oxydant sur l'HBP.

L'étude se fera en deux phases. D'abord, une étude pilote sera réalisée afin de déterminer la dose du composé à administrer afin d'atteindre la concentration sérique active. Trois doses différentes du composé ou l'excipient seul seront administrées par gavage à des souris mâles sauvages et le sang sera prélevé post-mortem 6 heures après injection pour réaliser les dosages. Dans l'étude

d'efficacité, la dose sélectionnée sera administrée aux souris qui développent une HBP ; un groupe d'animaux contrôles recevra seulement l'excipient. L'administration se fera par gavage quotidien sur une durée de 28 jours. Tous les animaux seront euthanasiés au terme des 28 jours de traitement afin de récupérer la prostate. Un groupe de référence sera aussi ajouté consistant en l'administration dans l'eau de boisson d'une molécule anti-oxydante classique.

Les animaux seront étroitement surveillés lors de l'étude. Bien que le composé testé soit déjà utilisé chez l'homme et n'ait aucune toxicité renseignée, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire (ce qui n'est pas du tout attendu). Afin de limiter au maximum le stress lié au gavage et assurer le bien-être des souris, nous veillerons à l'enrichissement des cages (coton et maisons en carton). Pour respecter le principe des 3R, nous avons estimé la taille des groupes permettant une analyse statistique efficace, et la prostate d'un même animal sera utilisée pour la mesure de nombreux paramètres expérimentaux. Ce projet de 2 ans utilisera 68 animaux.

Nous anticipons que le composé d'intérêt devrait, de par son activité anti-oxydante, ralentir le développement de l'HBP, voire la faire régresser, et ce de manière plus efficace qu'un anti-oxydant classique. Si nous pouvions démontrer son efficacité sur l'HBP de la souris, ce serait un élément important pour proposer son utilisation chez les patients avec une HBP.

11336 La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative héréditaire caractérisée par des désordres moteurs apparaissant progressivement (chorée), un déclin cognitif et des troubles psychiatriques. La progression de la maladie est associée à une perte importante de neurones. Les patients meurent habituellement 15 à 20 ans après l'apparition des premiers symptômes. En France, 12.000 patients sont touchés et environ 6.000 personnes développeront la maladie dans les 20 prochaines années. Actuellement, les mécanismes de progression de cette maladie restent mal compris, ce qui complique l'établissement d'une stratégie thérapeutique.

Le but du projet est de comprendre les fonctions et dysfonctions de la Huntingtine, protéine dont la mutation conduit à la maladie d'Huntington. Il est admis que dans la maladie d'Huntington les fonctions de la Huntingtine sont altérées, ce qui contribue à la progression et à l'aggravation des symptômes. Mieux comprendre ces mécanismes est donc crucial pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Il est connu qu'une modification spécifique de la Huntingtine favorise la survie des neurones en culture cellulaire dans un contexte de la maladie d'Huntington : la phosphorylation sur un acide aminé particulier. Par ce projet, nous voulons comprendre les effets de cette modification sur le nombre de connections entre les neurones (synapses), leur maintenance, la survie neuronale et la mise en place de la mémoire.

La souris apparaît comme le modèle de choix pour ce projet compte-tenu de la similarité de l'organisation anatomo-fonctionnelle de son cerveau avec celle de l'homme et de l'existence chez cette espèce des outils de transgénése nécessaires. Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude (2 procédures expérimentales) est de 316. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Notamment, dès que possible, l'animal sera utilisé comme son propre contrôle afin de diminuer le nombre de groupes expérimentaux nécessaires. Ce projet implique de la neurochirurgie et certaines tâches comportementales correspondant à un niveau de douleur de classe modérée. La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance apparaissent.

Les résultats *in vitro* ayant été établis, il est maintenant important d'étudier le rôle de la phosphorylation de la Huntingtine de façon physiologique, c'est à dire, *in vivo*.

11337 Le cortex cérébral contrôle la perception sensorielle ainsi que les fonctions motrices et cognitives et joue donc un rôle essentiel dans le fonctionnement du cerveau des mammifères. La mise en place de cette structure au cours du développement embryonnaire nécessite une coordination très fine de la génération des différents types cellulaires, du contrôle de leur migration et de leur positionnement final. Un nombre croissant de données soutient l'idée que de nombreuses maladies neurologiques ont pour origine une altération de ces processus. Notre projet vise à étudier comment différents types de neurones sont générés au cours du développement du cortex, comment ils sont intégrés dans les bons circuits neuronaux et quels rôles jouent certains gènes dans ces phénomènes. A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de remplacement permettant de reproduire *in vitro* la complexité du cortex en développement, ce qui rend l'utilisation d'un modèle murin indispensable à la réalisation de ce projet. De plus, le cerveau de ces animaux se forme de manière très similaire aux autres mammifères.

Nous avons identifié des populations de neurones transitoires qui sont générées aux stades précoces du développement cortical, migrent pour se distribuer dans l'ensemble du cortex avant de disparaître par mort cellulaire programmée après la naissance. Nous avons pu démontrer que ces cellules jouent des fonctions cruciales sur le développement cortical au cours de leur migration et nous avons sélectionné plusieurs gènes candidats qui pourraient être impliqués dans ces fonctions. Nous cherchons maintenant à tester le rôle de ces gènes dans la migration et la fonction des neurones transitoires. Pour manipuler l'expression génique de nos candidats spécifiquement dans les cellules transitoires au cours du développement embryonnaire, nous utiliserons un protocole d'électroporation *in utero* permettant l'expression de séquences d'ADN d'intérêt dans le cerveau d'embryons sauvages ou génétiquement modifiés au cours du développement. Cette technique consiste à appliquer un champ électrique sur les membranes cellulaires pour augmenter leur perméabilité et est bien tolérée par les embryons. Lorsque les cerveaux des souris électroporées devront être analysés plus de 2 jours après la naissance, les animaux subiront la procédure de perfusion intracardiaque afin d'assurer une fixation optimale du tissu, n'impliquant qu'une seule injection d'anesthésique. Durant les 5 années que dure ce projet nous allons utiliser au total 2542 animaux à des stades embryonnaires, postnataux ou adultes.

L'utilisation de l'expérimentation animale pour nos travaux est rendue nécessaire par la complexité de l'environnement cortical qui ne peut pas être recréé par des approches *in vitro*. Toutefois, dans le respect de la règle des « 3R » (remplacer, réduire, raffiner), nous diminuerons au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en atteignant la significativité statistique. Nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques lors des procédures opératoires et postopératoires, et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement. Tout signe de souffrance constaté (prostration, poil hérissé, lésion cutanée, diminution de la prise d'eau et/ou de nourriture) lors du suivi bi-quotidien ou toute autre altération de l'état de santé conduira à une euthanasie des animaux.

A terme, les résultats de ces travaux pourront nous permettre de mieux comprendre le rôle de nos cellules d'intérêts dans le développement cortical chez la souris mais aussi d'appréhender leur importance dans la mise en place et le fonctionnement du cerveau chez l'homme, dans un contexte normal mais aussi pathologique.

11338 Dans le but d'étudier certaines maladies, il peut être nécessaire d'induire une modification de métabolisme et/ou de paramètres physiologiques en modifiant le régime alimentaire des animaux. Par exemple, une alimentation riche en matières grasses a été liée à un grand nombre de maladies, dont l'obésité, les maladies métaboliques et inflammatoires.

Ce projet vise à produire des modèles animaux avec des modifications induites par l'alimentation dans le but de répondre aux attentes des chercheurs.

Ces modèles pathologiques sont issus de mécanisme complexe avec des processus de régulation impliquant l'ensemble de l'organisme. Ils permettent d'observer les conséquences des pathologies dans l'ensemble des organes, tissus et fonctions physiologiques et qui ne peuvent être remplacés par aucune méthode alternative.

Les animaux sont hébergés dans des conditions adaptées à leur bien-être, en accord avec la réglementation en vigueur et les recommandations éthiques internationales. Un enrichissement est également présent dans les cages d'hébergement.

En fonction des modifications du métabolisme attendu, un suivi clinique approfondi avec prélèvement de sang pourra être mis en place, si nécessaire les prélèvements seront réalisés sous anesthésie.

De plus des points limites ont été définis, la procédure sera arrêtée en cas d'atteinte d'un de ces points limites.

Pour chaque procédure, le nombre d'animaux utilisés et produits est défini en fonction des besoins des scientifiques et dans le respect du principe de réduction du nombre d'animaux utilisés.

Le nombre d'animaux utilisé pour ce projet sera d'environ 50 000 animaux sur 5 ans (50% de rats et 50% de souris).

11339 La réglementation en vigueur concernant la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Décret n° 2013- 118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques) requiert que le personnel soit compétent. Le personnel et les utilisateurs de notre animalerie suivent les formations théoriques obligatoires. Afin de compléter ces formations théoriques, nous offrons à nos nouveaux arrivants ainsi qu'aux personnes souhaitant maintenir leurs compétences techniques, la possibilité d'apprendre des techniques d'administrations ou de prélèvements sanguins réalisés couramment dans nos animaleries, dont ils ont besoin pour leurs projets. L'ensemble de nos projets se déroulant sur animaux vivants, il ne nous est pas possible de réaliser des formations autrement chez la souris. Cette formation pratique est dispensée par des personnes expertes. Tout au long de cette formation, une attention particulière est apportée au respect des 3 R : Remplacer ; Réduire ; Raffiner.

Remplacer : Afin de réduire le stress à la fois chez l'animal et chez l'expérimentateur une partie de la formation sera réalisée sur des modèles d'imitation souris (souris factice), mais la dernière partie de la formation doit se faire sur animal vivant car la manipulation des êtres vivants demande de la maîtrise qui ne peut s'acquérir qu'en pratiquant avec l'animal vivant.

Réduire : Ce projet vise à former les expérimentateurs aux gestes de base qui lui seront nécessaires pour mener à bien son projet de recherche. Pour limiter le nombre d'animaux nécessaire, le geste est d'abord expliqué à l'aide de schémas et éventuellement de vidéos.

Pour la partie pratique nous n'utiliserons que des animaux nés dans notre animalerie qui ne peuvent pas être utilisés dans d'autres projets et destinés à être euthanasiés, par exemple parce qu'ils sont nés avec un génotype non souhaité. Ce nombre sera réduit si la maîtrise du geste est acquise avant d'avoir utilisé tous les animaux prévus pour l'apprentissage du geste.

Raffiner : Avant d'expérimenter sur des animaux vivants, le geste est expliqué par le formateur, puis l'apprenant observe des personnes expertes dans la réalisation de ces gestes. Les animaux utilisés sont hébergés en groupe sociaux de 3 à 5 animaux dans des cages ouvertes, changées toutes les semaines. L'environnement des cages est enrichi à l'aide de carrés de cellulose et de frisure pour la construction des nids, de tunnels pour permettre aux animaux de se cacher et ainsi diminuer le niveau de stress. Une nourriture adaptée pour les rongeurs et l'eau de boisson sont données *ad libitum*. Le nombre d'essais sur les animaux est limité de 1 à 4 selon les techniques avec ou non l'anesthésie de l'animal (mélange kétamine-xylozine avec surveillance de la température corporelle) et les animaux sont euthanasiés à la fin de la procédure afin d'éviter tout mal-être dû à la maladresse des apprenants. L'euthanasie des animaux sera réalisée par le formateur.

Nous utiliserons au maximum 20 souris par session de formation (10 stagiaires au maximum par session) avec 6 sessions par an soit une estimation de 600 souris sur 5 ans. Cette estimation est établie pour former 300 personnes à 10 gestes différents.

11340 Plusieurs études épidémiologiques ont montré que les patients atteints de la maladie de Parkinson (MP) développent moins de tumeurs cérébrales que les autres. Or, on sait que plusieurs protéines responsables des formes génétiques de la MP régulent la prolifération et la mort cellulaire programmée suggérant la possibilité de mécanismes moléculaires communs mais aux effets opposés dont la compréhension pourrait aider à soigner les cancers cérébraux. Ce projet vise ainsi à étudier chez la souris le rôle de différentes protéines impliquées dans la maladie de Parkinson, sur la genèse et le développement des tumeurs cérébrales. A cette fin, des cellules tumorales génétiquement modifiées pour surproduire ou ne pas produire ces protéines d'intérêt seront injectées dans le cerveau de souris dont certaines sont elles-mêmes génétiquement modifiées, afin d'évaluer leur impact sur la prolifération tumorale et, incidemment, de mesurer leur potentiel thérapeutique dans le traitement des cancers cérébraux.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 3984 souris sur 5 ans. Les procédures décrites ont été pensées dans le strict respect éthique de la règle des 3R. Remplacement : Les résultats obtenus par des approches *in vitro* de biologie cellulaire ont permis d'identifier des dysfonctionnements moléculaires et de caractériser les protéines intervenant dans le développement de la MP et du cancer cérébral. Mais l'installation et la prolifération tumorales sont des processus hautement dépendants d'un environnement cellulaire et physiologique qu'il est à l'heure actuel impossible de reproduire *in vitro*. Afin de tester nos hypothèses quant au potentiel thérapeutique de certaines protéines associées à la MP pour le traitement des tumeurs cérébrales, il nous est indispensable de suivre la survenue et l'évolution tumorale *in vivo* dans le contexte physiologique d'un organisme intégré. Par ailleurs nous avons choisi la souris pour laquelle nous disposons de lignées génétiquement modifiées indispensables à la validation de nos hypothèses.

Réduction : les effectifs des groupes expérimentaux d'animaux ont été déterminés sur la base de calcul de puissance et de tests statistiques nous permettant de les réduire au strict nécessaire. Bien que l'injection des cellules tumorales dans les cerveaux des souris soit une procédure chirurgicale techniquement maîtrisée et qui n'engendre pas de dommages à la souris, des mesures de raffinement seront adoptées.

Raffinement : les procédures ont été affinées grâce à l'optimisation des soins, la réduction du temps d'expérimentation. Les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec régulation de la température corporelle des animaux via un tapis chauffant. Elles seront par ailleurs accompagnées d'une prise en charge de la douleur par l'administration de traitements pré et post opératoires d'analgésiques. Des points limites précoces et adaptés ont été établis d'après une grille d'observation des animaux qui permettront leur suivi tout au long des procédures.

11341 Les maladies mitochondriales sont des maladies héréditaires complexes qui manifestent des pathologies impliquant les grands systèmes. Plusieurs études démontrent que la morphologie des mitochondries (morphologie mitochondriale ou dynamique mitochondriale) joue un rôle majeur dans les différentes fonctions mitochondriales et le métabolisme cardiaque. Actuellement, il n'existe aucun modèle spécifique permettant l'étude de la morphologie mitochondriale *in vivo* dans le développement des pathologies cardiaques. Nous avons créé des modèles murins qui nous permettent de manipuler la morphologie mitochondriale avec des outils génétiques ciblant le gène MTP18. MTP18 a déjà été décrit comme médiateur essentiel de la morphologie mitochondriale *in vitro*.

Pour respecter la règle des 3R, le rôle de MTP18 comme modulateur de la morphologie mitochondriale a d'abord été étudié *in vitro* dans différentes lignées cellulaires. Ces modèles ont permis d'identifier le mécanisme par lequel ce MTP18 contrôle la morphologie mitochondriale et les conséquences d'un changement morphologique sur le métabolisme des mitochondries. *In vitro*, ceci représente l'outil le plus spécifique pour étudier la morphologie mitochondriale, mais les cellules en culture ne permettent pas d'étudier la pathologie retrouvée chez les patients présentant des maladies mitochondriales. Nous proposons de mettre en place de nouveaux modèles de maladies mitochondriales *in vivo*, ciblant le cœur chez la souris. Dans le but de comprendre les fonctions du produit de ce gène, MTP18, et ainsi comprendre les mécanismes à l'origine de la pathologie chez les patients, nous étudions un modèle de souris mimant l'inactivation (knockout) ou la surexpression

(transgénique) de ce gène. L'étude de ces modèles au cours du temps et sous stress cardiaque (régime diabétogène ou simulation d'ischémie/reperfusion par voie chirurgicale), nous permettent de mieux comprendre les processus mis en cause afin d'envisager des voies d'intérêt thérapeutiques dans l'avenir. De plus ces modèles souris représentent des outils de choix pour tester des molécules pharmacologiques afin de ralentir ou inverser les processus pathologiques. 4 procédures expérimentales seront utilisées (2 de sévérité légère, et 2 de sévérité modérée). Pour gérer la douleur, nous effectuerons un suivi rigoureux et régulier des animaux, utiliserons des analgésiques quand cela sera nécessaire, et avons défini des points limites. Les opérations chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie adaptée. Le nombre d'animaux nécessaires a été obtenu par un calcul de puissance statistique en collaboration avec un biostatisticien, et est basée sur le nombre minimum d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement robustes et reproductibles. Plusieurs paramètres seront étudiés chez chaque animal, les animaux contrôles et mutants seront produits simultanément par les mêmes croisements. Cette étude est prévue sur 5 ans et nécessitera au total 243 souris mâles adultes entre 1 et 12 mois d'âges.

11342 La maladie d'Alzheimer est un syndrome neurodégénératif associé à une démence progressive et irréversible, qui s'accompagne fréquemment de symptômes psycho-comportementaux comme la dépression, l'anxiété ou encore l'apathie. Au niveau histologique, la maladie se caractérise par la présence dans le cerveau de dépôts de protéines agrégées extracellulaires, les plaques séniles, enrichies en peptide amyloïde (A β). Pour étudier les aspects moléculaires et cellulaires de la maladie d'Alzheimer de manière intégrée, le recours à des modèles animaux est indispensable. A ce jour plusieurs modèles transgéniques murins de la maladie d'Alzheimer ont été créés et présentent de fortes similitudes avec la pathologie humaine. Le modèle de souris triple transgéniques que nous utilisons à l'avantage de reproduire au mieux la maladie d'Alzheimer puisque ces souris développent les marqueurs histopathologiques de la maladie ainsi que les défauts d'apprentissage et de mémorisation s'aggravant avec l'âge.

Au laboratoire, nous avons observé dans ce modèle de souris alzheimerisées une accumulation précoce et intra-neuronale d'un fragment pathogène (le précurseur direct du peptide A β), qui est corrélée avec l'apparition d'un phénotype apathique des souris. Nous avons démontré que l'accumulation de ce fragment est due à un dysfonctionnement de la principale voie de dégradation des protéines agrégées, mais également que cette accumulation peut aussi contribuer en retour à ce dysfonctionnement. L'accumulation de ce fragment semble donc avoir un rôle toxique dès les premiers stades de la maladie. Une suppression ou une simple réduction de l'accumulation de ce fragment pathogène pourrait ainsi avoir pour effet de prévenir les symptômes de la maladie et incidemment d'envisager de nouvelles orientations thérapeutiques pour soigner la maladie d'Alzheimer.

Le but de ce projet consiste à tester cette hypothèse en suractivant, via une stratégie génétique, cette voie de dégradation des protéines pour réduire/abolir l'accumulation du fragment pathogène et annihiler ainsi ces effets neurotoxiques. Nous souhaitons agir à deux stades différents d'évolution de la pathologie : dès la naissance et à l'âge adulte (3 mois). Les effets de cette manipulation seront mesurés par tests comportementaux, biochimiques et immunohistochimiques sur nos modèles transgéniques murins de la maladie d'Alzheimer.

Ce projet d'intérêt scientifique met en œuvre la règle des 3R :

Remplacement : La maladie d'Alzheimer est une maladie complexe qui se caractérise notamment par des altérations comportementales et cognitives évoluant avec le temps. De nombreux travaux ont été préalablement réalisés *in vitro* sur des cellules en culture afin de caractériser les mécanismes moléculaires et biochimiques sur lesquels nous nous proposons d'agir dans ce projet. Cependant, aucun modèle cellulaire n'est aujourd'hui capable de reproduire les paramètres nous permettant de tester notre hypothèse.

Réduction : Le nombre de souris a été réduit au strict nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables. La taille des groupes expérimentaux a été établie d'après des calculs de puissance statistique à l'aide d'un logiciel ad hoc. Pour limiter le nombre d'animaux utilisés,

l'ensemble des expériences de comportement, d'analyses biochimiques et d'immunohistochimiques sera réalisé sur les mêmes groupes d'animaux.

Raffinement : Les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale accompagnée de soins analgésiques pré et post-opératoires. Tout au long du projet les animaux feront l'objet d'une observation quotidienne appuyée sur des critères d'observation permettant d'objectiver les contraintes subies par les animaux et leurs conséquences sur leur bien-être. L'utilisation de cette grille d'évaluation et de fiche de suivi permettra de limiter ces contraintes, soit par l'administration de soins appropriés, soit par la mise en œuvre de points limites précoces et adaptés préalablement établis.

Pour ce projet nous utiliserons au maximum 480 souris et 54 rats.

11343 L'arthrose est une maladie très fréquente qui touche les articulations, notamment les genoux, et qui est caractérisée par une dégradation progressive du cartilage articulaire, sans infection. Dans les articulations affectées, la surface du cartilage se fissure, s'effrite et finit par disparaître. Cela s'accompagne du développement d'excroissances osseuses (les « becs de perroquet ou ostéophytes »).

L'ensemble de ces lésions est la cause de douleur chronique et conduit à un enraidissement des articulations qui nuit aux mouvements. Outre l'âge, l'obésité est un facteur associé à l'arthrose : l'obésité comporte un surpoids et donc une surcharge pour l'articulation du genou, mais de plus elle est souvent associée à un métabolisme anormal (diabétique) et un état d'inflammation à bas niveau dans tout le corps, aggravant la pathologie articulaire. La probabilité de développer l'arthrose est beaucoup plus importante pour un individu obèse que pour un individu non-obèse. Aucun traitement médicamenteux efficace de l'arthrose n'est actuellement disponible, les mécanismes de survenue de cette maladie sont encore mal connus.

La restriction alimentaire et ses modèles alternatifs - tels que le régime diététique cétogène, riche en gras et protéines, mais très pauvre en glucides - ont démontré leur impact positif non seulement sur le métabolisme, mais aussi sur différentes pathologies dégénératives et inflammatoires. Le régime cétogène est en général bien toléré et il peut être envisagé, par exemple, dans le contexte du traitement de l'épilepsie chez les enfants.

Plusieurs études suggèrent que le régime cétogène pourrait être bénéfique pour le tissu cartilagineux.

Premièrement, ce régime pourrait limiter le syndrome métabolique chez l'obèse, et donc l'inflammation et la dégradation du cartilage qui l'accompagnent. Une étude de l'équipe (déjà approuvée et actuellement en cours) teste, dans un modèle préclinique murin, l'hypothèse que le régime cétogène est bénéfique pour des individus obèses et arthrosiques, et étudie son effet sur la progression de l'arthrose et l'évolution du profil métabolique.

Deuxièmement, ce régime augmente de manière naturelle le taux sanguin d'un métabolite (le beta-hydroxy-butyrate (BHB) qui agit comme inhibiteur d'enzymes nommés histone désacétylases. Hors, ce dernier point est important, car une publication a montré que la Trichostatine A (TSA), aussi inhibiteur des histone désacétylases, améliore l'arthrose dans un modèle murin, au moins chez des souris non obèses.

Pour que nous puissions mieux comprendre et correctement interpréter les résultats obtenus avec le traitement de l'arthrose par le régime cétogène, nous voulons évaluer l'impact d'un traitement avec la TSA sur la progression de l'arthrose, l'os, le métabolisme et l'inflammation chez des souris obèses. Ainsi, nous pourrions comparer ces résultats avec ceux obtenus suite au traitement par régime cétogène sur le même type de souris obèses (même lignée, âge, sexe et état métabolique).

Comme dans l'étude en cours, nous utiliserons un modèle de souris obèse arthrosique déjà développé dans notre équipe. L'arthrose des genoux sera induite par chirurgie chez des souris obèses et diabétiques, qui seront après traitées avec de la TSA ou avec un placebo pour une période de 8 semaines. Nous analyserons la physiologie squelettique et le métabolisme des souris, avec des examens très peu invasifs sur l'animal vivant (prise de sang, densitométrie osseuse). Ainsi

nous examinerons différents paramètres de l'articulation, des os et du métabolisme des souris, pour évaluer la progression de l'arthrose et du syndrome métabolique.

Dans ce modèle d'arthrose, les souris déambulent très rapidement après la chirurgie et ne montrent aucun signe de stress. Un analgésique est administré avant, pendant et après l'opération, qui s'effectue sur des souris anesthésiées et avec tous les soins per-opératoires nécessaires.

Dans plusieurs publications, il est démontré que le traitement avec la TSA est aussi bien toléré par les souris.

L'étude des processus dégénératifs à l'origine de l'arthrose associée à l'obésité ne peut se concevoir qu'à travers une analyse systémique globale, tant les liens entre métabolisme énergétique, musculaire et squelettique sont étroits.

L'analyse de la cinétique de la maladie arthrosique ne peut être réalisée :

- *in vitro* : car c'est l'interaction des tissus de l'articulation (cartilage, os, muscle) sous l'influence de facteurs systémiques, qui est étudiée ici. Des co-cultures cellulaires ne pourraient non plus nous donner ce genre d'information.

- chez l'Homme : car les prélèvements effectués le sont lors de mise en place de prothèse c'est-à-dire au stade le plus tardif d'évolution de la maladie.

Afin de mener à bien ce projet, 40 souris C57Bl6/J mâles matures sur le plan squelettique seront nécessaires. Ce nombre comprend les animaux pour effectuer les deux différents groupes soumis aux traitements pharmacologiques post-chirurgie, notamment la TSA et le placebo. Ce nombre ne peut-être plus diminué sans risque de mettre en péril l'interprétation statistique.

Le projet proposé se base sur les résultats d'études précédentes.

Souvent, l'arthrose est induite dans un seul genou. Nous privilégions l'induction bilatérale sur les deux genoux des pattes postérieures, pour deux raisons : premièrement, cela nous permet d'obtenir le nombre de genoux arthrosiques nécessaire pour toutes nos analyses avec la moitié de souris ; deuxièmement, cette situation reflète la condition des personnes obèses arthrosiques, où normalement l'arthrose atteint les deux genoux.

Lors de la réalisation de cette étude, chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérés grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgésie). Les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 3), dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger) dans une salle aménagée pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux. Eau et nourriture sont mises à disposition "*ad libitum*".

11344 Il est maintenant bien établi qu'il existe une formation de nouveaux neurones tout au long de la vie dans l'hippocampe des mammifères, et que ce phénomène joue un rôle dans la mémoire spatiale. Les nouveaux neurones produits (néo-neurones) s'intègrent aux réseaux formés de neurones issus de la période développementale, mais semblent posséder des propriétés spécifiques. Nous avons récemment démontré que la stimulation des neurones nés à l'âge adulte pouvait améliorer les performances de mémoire spatiale à long terme. En effet, la stimulation des néo-neurones réalisée avant un test de rétention effectué 4 semaines après l'apprentissage spatial améliore considérablement la précision de la mémoire. Dans ce projet, nous voulons démontrer que ces effets sont spécifiques des nouveaux neurones. Pour ce faire, nous devons stimuler les neurones du développement, générés dans les premiers jours de la vie post-natale.

La stimulation des neurones se fera par une approche virale de pharmacogénétique. En effet nous injecterons des virus qui ont la particularité de ne s'incorporer que dans les cellules en division et donc uniquement dans les cellules qui sont générées le jour de l'injection. Grâce à la présence de molécules spécifiques dans ces virus (appelées Dreads), les cellules infectées peuvent être spécifiquement activées par simple injection intra-péritonéale de la Clozapine-N-Oxide (CNO) qui se lie spécifiquement à ces molécules.

Dans cette étude, des rats âgés de 3 jours seront injectés au niveau du cerveau avec les virus Dreads ou des virus contrôles. Puis à l'âge adulte, les rats seront entraînés dans la tâche de navigation spatiale du labyrinthe aquatique. Quatre semaines plus tard, les performances de mémoire seront testées au cours d'un test de rétention après injection de CNO. A la suite de l'étude comportementale nous vérifierons par des techniques d'immunologie les taux d'infection des virus.

Afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment, dans un souci de respect du R de réduire, nous prévoyons un maximum de 15 rats par groupe, soit 60 rats au total, nombre minimal nécessaire pour faire des analyses statistiques cohérentes. Aussi, dans le respect du R de raffiner, un soin particulier sera accordé à l'observation des animaux et à leurs conditions d'hébergement, en particulier lors des périodes post chirurgicales. De plus, des traitements appropriés (anesthésie, anti-inflammatoire, anti-douleur) seront utilisés pour pallier la douleur associée aux manipulations d'injections. En ce qui concerne le remplacement, il est important de noter que cette étude nécessite la visualisation et l'intégrité d'un réseau englobant différentes régions du cerveau et qu'il ne peut donc être réalisé sur des modèles *in vitro*.

11345 La Pyrimidine est un constituant essentiel de de notre organisme, notamment utilisé dans le code génétique de l'ADN. Pour éviter son accumulation, notre corps utilise une enzyme : la dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), codée par le gène DPYD. La mutation de ce gène peut entraîner des symptômes neurologiques (retards psychomoteurs, convulsions, retards de croissance,..), ou favoriser l'apparition de nouvelles mutations génétiques et/ou le développement de tumeurs. Ce projet vise à étudier l'impact d'une augmentation de pyrimidine dans l'organisme sur certaines pathologies humaines, un modèle de souris porteur d'une mutation pour le gène DPYD a été généré. Des études préliminaires sur des animaux jeunes ont mis en évidence des altérations significatives de la composition sanguine, notamment en globules blancs. Ce déficit a été observé chez des souris âgées de 16-19 semaines, mais pas sur des souris de 7 semaines, indiquant que ce problème pouvait avoir une progression lente. L'objectif de cette étude est ainsi d'analyser le défaut de maturation des globules blancs, et la possible apparition de tumeurs au cours de la durée de vie des souris mutantes pour le gène DPYD. Ces résultats seront ensuite confrontés à ceux des patients porteurs d'une mutation similaire, afin de déterminer s'il existe un lien entre formulation sanguine en globules blancs et présence de tumeurs. Cette étude complémentaire sera réalisée sur une cohorte de 10 souris mutantes et 10 souris contrôles. Un prélèvement sanguin sera effectué tous les 2 mois pour réaliser une numération de la formule sanguine, permettant de connaître les quantités et qualités des globules blancs. L'état de santé des animaux sera suivi de manière très rapprochée afin de détecter toute anomalie le plus précocement. En cas de mort d'un animal ou d'euthanasie pour des raisons éthiques, celui-ci sera autopsié afin de détecter toute anomalie, ou l'apparition de tumeurs. Remplacement : L'approche animale se justifie par l'existence de plusieurs souris mutées pour ce gène d'intérêt, permettant de réaliser une étude sur l'animal afin de se rapprocher de la physiopathologie humaine, notamment pour l'analyse des paramètres sanguins. Réduction : Nous allons utiliser une cohorte de 10 animaux mutants et 10 animaux contrôles. Ce nombre est réduit à son minimum nous permettant d'avoir des résultats interprétables et statistiquement significatifs. Raffinement : les animaux feront l'objet d'un suivi rapproché afin d'éviter toute souffrance (points limites).

11346 La cécité nocturne congénitale stationnaire (CNCS) est un groupe de pathologies rétinienne cliniquement et génétiquement hétérogène. La plupart des personnes atteintes ont une acuité visuelle basse, associée à des difficultés d'orientation en condition de faible luminosité. De nombreux patients présentent également d'autres anomalies oculaires telles qu'une forte myopie (< -6 dioptries), un strabisme ou un nystagmus. Parmi les différentes formes de CNCS, la forme complète, CNCS_c, se caractérise par un dysfonctionnement de la transmission du signal entre les photorécepteurs et une classe de cellules bipolaires. Ce mécanisme n'est actuellement toujours pas bien compris.

Dans ses études, l'équipe a identifié que des mutations dans différents gènes étaient associés à la CNCSc dont des mutations du gène GRP179 qui nous intéresse plus particulièrement. Dans ce projet, nous proposons d'élucider le rôle de cette protéine dont certaines mutations sont associées à la CNCSc. Précédemment nous avons déterminé que le phénotype de souris invalidées pour Gpr179 représente aussi un CNCSc. L'analyse fonctionnelle *ex vivo* permettra de valider le phénotype de cécité nocturne des animaux portant la mutation GRP179. Au total, 150 souris seront nécessaires à cette étude.

En respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R », 1) remplacement : Etant donné qu'il n'est possible de reproduire un modèle de cécité nocturne *in vitro*, nos études nécessitent l'utilisation d'un modèle animal.

2) réduction : le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. 3) raffinement : Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Les animaux seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les animaux bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse). Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien-être.

11347 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une pathologie très fréquente et invalidante qui représente un enjeu de santé publique. Cette pathologie auto-immune induit une inflammation chronique des articulations conduisant à la destruction des os et du cartilage, pouvant aboutir à des déformations irréversibles des articulations. Le psoriasis est également une maladie inflammatoire chronique, touchant principalement la peau mais présentant de fortes similitudes sur le plan immunologique avec la PR, d'autant plus qu'il peut parfois s'accompagner d'une atteinte articulaire (on parle alors de rhumatisme psoriasique). Il s'agit d'un bon modèle d'exploration des mécanismes qui sous-tendent le phénomène inflammatoire.

De nombreux facteurs environnementaux ont été incriminés dans la physiopathologie de la PR et comme éléments aggravants de celle-ci : le tabagisme, la pollution, etc. Le régime alimentaire semble également avoir un rôle sur l'activité de la PR et l'apport en sel a été tout particulièrement étudié ces derniers temps, mais essentiellement dans des modèles murins de sclérose en plaque, de lupus ou de colite inflammatoire.

Notre objectif est donc d'explorer l'effet *in vivo* au plan de l'inflammation et de l'immunité d'un régime hypersalé dans des modèles murins d'arthrite et de psoriasis, afin de mieux comprendre la physiopathologie de la PR et du psoriasis et d'optimiser la prise en charge des patients. Ce projet de recherche nécessitera l'utilisation de 440 souris au maximum, sur 3 ans et se fera en accord avec la règle des 3R. Les mécanismes que nous souhaitons étudier demandent d'avoir un système immunitaire complet et proche de celui de l'homme. L'utilisation de la souris est donc tout indiquée dans cette étude et ne peut être remplacée. Le nombre d'animaux a été limité au minimum pour obtenir une puissance statistique suffisante. Nous évaluerons le développement de l'arthrite et du psoriasis à l'aide de paramètres cliniques et histologiques. Un suivi très précis est mis en place pour éviter toute souffrance inutile des animaux, des points-limites ont été établis avec une grille d'évaluation qui a été développée spécifiquement pour ce type d'étude.

11348 L'efficacité de la chimiothérapie anticancéreuse repose sur sa capacité à induire la mort des cellules tumorales selon 2 modes d'actions : 1) directement, par toxicité de l'agent chimiothérapeutique au sein de la cellule tumorale et 2) indirectement, par induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Cependant, cette chimiothérapie anti-cancéreuse est fréquemment associée avec de nombreux effets secondaires et une toxicité avérée. Notre équipe a récemment montré chez la souris transgénique un impact direct de l'expression de la protéine HBSP du Virus de l'hépatite B (VHB) sur la carcinogenèse hépatique.

Le but de ce projet est d'étudier l'impact d'une nouvelle approche thérapeutique présentant peu ou pas d'effet secondaire, en détournant les propriétés biologiques de la protéine HBSP du VHB et ce afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique du cancer du foie.

Pour répondre à cette question, des animaux sont indispensables car il n'est pas possible d'étudier l'impact de cette nouvelle approche thérapeutique sur la croissance tumorale dans des systèmes *in vitro*. Dans ce but, nous projetons d'utiliser au cours des 5 années à venir un maximum de 240 souris (génétiquement modifiées) sur lesquelles nous pourrions transférer les tumeurs du foie de patients nouvellement résequées à l'hôpital.

Dans le but d'évaluer la réalisation de ce projet, des expérimentations ont été mises au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement ainsi que pour permettre une évaluation de la faisabilité et une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si l'expérience initiale invalide l'hypothèse de travail. Les animaux bénéficieront d'un milieu enrichi et seront observés quotidiennement afin de surveiller leur bien-être. Nous tiendrons compte du stress et/ou de la douleur éventuelle au moment de l'expérimentation et adapterons nos conditions expérimentales à ces paramètres, si nécessaire.

Enfin, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation redondante.

11349 Les migraines constituent un problème de santé publique ayant un impact négatif majeur dans la vie quotidienne des patients. Les crises de migraine qui concernent 20% des femmes pour 6% d'hommes, sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée ou sévère, unilatérales, pulsatiles, pouvant durer entre 4 et 72 heures en l'absence de traitement. Ces céphalées sont associées à des modifications de la perception sensorielle telles que l'allodynie (douleur provoquée par une stimulation non douloureuse), la phonophobie et/ou la photophobie. Ainsi la physiopathologie de la migraine implique des régions cérébrales multiples pour rendre compte à la fois de la douleur et des troubles sensoriels associés. L'étude des mécanismes physiopathologiques nécessitent donc d'avoir recours à l'animal afin de tenir compte de toutes les interactions cérébrales qui entrent en jeu lors d'une crise migraineuse.

Dans ce projet, nous étudierons les mécanismes d'action de la Grande Camomille et de l'écorce de Saule Blanc, qui associées pourraient constituer un traitement de fond des crises de migraine. En effet la Grande Camomille est une plante reconnue traditionnellement pour soulager la migraine, tandis que l'écorce de Saule Blanc a des propriétés anti-inflammatoires. Pour réaliser cette étude, nous utiliserons un modèle murin qui mime la phase de céphalée ou mal de tête de la migraine. Il consiste en l'injection de substances inflammatoires à la surface des méninges.

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum. Dans ce but, les animaux auront une période d'habituation à l'expérimentateur et aux tests avant de débiter l'étude comportementale. Cette période d'habituation permet de réduire le stress des animaux lors des tests comportementaux et ainsi de réduire le nombre d'animaux. Par ailleurs, notre modèle nécessite une chirurgie pendant laquelle nous implantons une canule pour l'injection des substances inflammatoires : elle est effectuée sous anesthésie générale (chloral hydrate, 400 mg/kg), les animaux sont placés sur une couverture chauffante pendant le temps de la chirurgie et leur cornée est protégée par une couche de vaseline. Le temps de chirurgie est optimisé au maximum pour qu'il dure le moins longtemps possible. Les animaux sont gardés dans la pièce de chirurgie en observation jusqu'à leur réveil complet. D'après les études précédentes, notre modèle animal n'entraîne pas de dommages tissulaires. Les dommages attendus, mis en évidence précédemment dans notre modèle, sont une douleur céphalique utilisée pour modéliser la crise de migraine. Le nombre d'animaux dans cette étude tient compte des animaux non répondeurs dans notre modèle mais reste suffisant pour détecter un effet significatif entre les traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non). Au total 48 rats seront nécessaires à la réalisation de ce projet. Ils seront euthanasiés à la fin des procédures par overdose d'anesthésique.

Avoir un modèle qui se rapproche le plus possible des conditions cliniques permettra par la suite de déterminer les substances et doses pharmacologiques susceptibles d'être une alternative aux traitements proposés aux patients migraîneux.

11350 Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche fondamentale qui vise à élargir les connaissances afin de prolonger la survie des prothèses de hanche chez l'Homme qui sont à ce jour le seul traitement efficace devant une arthrose avancée.

En effet, le remplacement articulaire prothétique est l'intervention chirurgicale de référence dans le traitement des lésions dégénératives des articulations du membre inférieur (prothèse totale de hanche pour traiter l'arthrose). Plus de 1 million/an de prothèses sont ainsi implantées dans le monde et 150 000/an en France, et avec le vieillissement de la population, ce nombre est en constante progression. La longévité des implants devient donc un réel enjeu économique.

La perte de fixation de l'implant dans le tissu osseux est une des complications principales à long terme des prothèses totales de hanche (PTH). Cette perte de fixation qui est liée à une perte de l'ostéo-intégration est à l'origine de limitations fonctionnelles et de douleurs. Cela nécessite une nouvelle intervention chirurgicale pour remplacer la PTH. Cette intervention est techniquement complexe et s'accompagne d'un taux élevé de morbidité et de mortalité chez les patients.

Cette perte de fixation appelée aussi descellement aseptique ou ostéolyse péri-prothétique est associée à la dégradation de l'os autour de la prothèse. En effet, l'usure de la prothèse liée aux couples de frottement entre le polyéthylène (PE) du cotyle avec le métal de la tête fémorale, libèrent des particules d'usure de polyéthylène (PE). Ces dernières entraînent une réaction inflammatoire responsable de l'ostéolyse péri-prothétique et donc de la perte de contact (ou perte de l'ostéo-intégration) entre l'os et la prothèse de hanche.

Il existe différents types de PE liés à leurs procédés de fabrication permettant d'obtenir des propriétés physico-chimiques spécifiques. Le 1er type de PE utilisé est le polyéthylène conventionnel de haut poids moléculaire (UHMWPE = ultra-high-molecular-weight-polyethylene). Afin d'augmenter sa résistance à l'usure et donc de diminuer le nombre de particule d'usure celui-ci est réticulé par recombinaison des chaînes macromoléculaires du matériau (material cross-linking). Ce polyéthylène hautement réticulé nommé HXLPE (pour highly-cross-linked-polyethylene) génère la formation de radicaux libres qui sont à l'origine d'une dégradation oxydative du matériau. Afin de diminuer le nombre de radicaux libres du HXLPE, des traitements thermiques sont associés à son processus de fabrication. Le mécanisme de dégradation du polyéthylène passant par la voie de l'oxydation, il nous paraît important d'étudier si le caractère oxydé ou non des particules d'usure a une influence sur leur comportement *in vivo*.

Ce projet a pour but d'étudier et de comparer le pouvoir ostéolyse péri-prothétique des particules d'usures de différents types de PE afin de sélectionner lequel induit le moins d'ostéolyse. Cette étude sera réalisée sur un modèle expérimental animal de souris d'ostéolyse péri-prothétique (modèle de référence). Ce modèle consiste à déposer des particules d'usure de PE sur l'os du crâne de souris âgées de 8 semaines. Ces particules d'usure de PE au contact du tissu osseux permettent de mimer ce qu'il se passe au niveau des prothèses de hanche chez l'homme : cela va induire une réaction inflammatoire responsable de l'ostéolyse. Ainsi ce modèle permet de déterminer l'innocuité des différents PE utilisés pour les prothèses de hanche et ainsi de choisir les matériaux les plus sûrs et d'éliminer les moins biocompatibles. Cette procédure est décrite et validée dans la littérature internationale.

Des groupes d'animaux seront constitués afin d'analyser les propriétés d'ostéolyse péri-prothétique des différentes particules d'usure de PE. Nous réaliserons une étude comparative entre les souris témoins et les souris des différents groupes de polyéthylène par une étude longitudinale de l'inflammation et de l'ostéolyse. Cette analyse *in vivo* avec suivi longitudinal permet de réduire le nombre d'animaux utilisé à 288 souris.

Le projet expérimental, les critères de surveillance et d'interruption ont été définis a priori selon les recommandations usuelles (raffinement).

Une analgésie post opératoire sera mise en place pour palier de probables douleurs. Un suivi quotidien de l'état physique et comportemental des animaux sera effectué. Dans le cas de douleurs persistantes et si les analgésiques sont sans effet notables ou en cas d'infection majeur non résorbable, l'animal sera retiré de l'étude et euthanasié.

Ce projet a pour but de sélectionner parmi l'ensemble des procédés de fabrications du PE lesquels permettent d'obtenir les particules d'usures les moins réactives afin de diminuer les processus d'ostéolyse péri-prothétique et de prolonger la fonctionnalité et la durée de vie des prothèses articulaires.

11351 La maladie de Parkinson (MP) se situe au second rang des maladies neuro-dégénératives les plus communes et se caractérise par la dégénérescence d'une population neuronale spécifique : les neurones de la structure cérébrale « substance noire » qui libèrent la dopamine afin de communiquer avec d'autres neurones présents dans une autre structure du cerveau : le striatum. Dans la MP, le dysfonctionnement de cet ensemble entraîne des symptômes moteurs : lenteur à initier un mouvement, rigidité musculaire et quelquefois tremblement de repos. Le traitement pharmacologique (dopaminergique) actuel a une efficacité moindre à long terme et provoque l'apparition d'effets secondaires. Nous avons récemment conduit un essai pilote ouvert sur 4 patients sous traitement dopaminergique utilisant le diurétique Bumétanide et avons montré une amélioration des symptômes moteurs.

Nos études expérimentales récentes ont montré que les neurones du striatum qui permettent de propager les informations dans d'autres structures du cerveau ne fonctionnent pas correctement dans des modèles souris de la MP. En effet, ils reçoivent une activité dite inhibitrice qui est aberrante et cette activité est bloquée par un traitement à la Bumétanide. Cette activité inhibitrice est due à différents types de neurones à l'intérieur du striatum (interneurones) qui changent le fonctionnement des neurones de projection qui propagent les informations dans d'autres structures du cerveau. Ces interneurones sont hyperactifs dans la MP. À la vue de la convergence des données cliniques et expérimentales, nous voulons d'une part mener des essais cliniques à grande échelle pour obtenir une autorisation de mise sur le marché et d'autre part comprendre les mécanismes qui sous-tendent les activités électriques aberrantes du striatum. Nos recherches expérimentales s'orienteront autour de deux grands axes : (1) décrire en détail le fonctionnement des interneurones du striatum grâce à l'utilisation de tranches aiguës de cerveau, (2) décrire l'activité de l'ensemble de ces interneurones chez la souris éveillée avec la tête fixée ou exerçant une tâche motrice. Ces différentes caractérisations seront menées chez la souris dans trois conditions : contrôle, modèle de la MP sans ou avec traitement à la Bumétanide.

Ce projet utilisera pour les expériences 425 souris adultes.

Avant les expériences, les animaux seront hébergés dans des cages enrichies et dans un environnement avec température, lumière et hygrométrie contrôlées avec accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau.

Afin de moduler l'activité des interneurones du striatum, nous utiliserons la technique d'optogénétique qui permet de changer (augmenter ou diminuer) l'activité des neurones que l'on choisit, dans notre cas, les interneurones. Avec l'utilisation de souris transgéniques et l'injection de virus non nocifs, ces interneurones d'intérêt changent leur fonctionnement en présence d'une certaine lumière. Ainsi, si l'on utilise une source lumineuse (sur de tranches aiguës de cerveau ou sur souris éveillée), l'activité des interneurones du striatum est modifiée. On peut aussi enregistrer l'activité des interneurones grâce à des électrodes d'enregistrement car l'activité qu'ils génèrent est une activité électrique.

Ainsi, pour injecter le virus, la toxine 6-hydroxydopamine (6-OHDA, génération du modèle de la MP), implanter une fibre optique (source lumineuse) et les électrodes d'enregistrement, il faut effectuer une chirurgie. Elle requiert une micro-perforation du crâne et de la dure-mère pour accéder à la structure cible : le striatum. L'injection de la toxine et l'implantation des électrodes se fait unilatéralement ; l'injection du virus et des fibres optiques de manière bilatérale. Puis nous cimenterons une barre sur le crâne pour fixer la tête des animaux dans l'appareil de comportement.

Après la récupération, les souris seront familiarisées avec l'expérimentateur puis entraînées à apprendre une tâche motrice adaptée.

Remplacement. A notre connaissance, aucun modèle expérimental autre que les préparations *ex vivo*, ou *in vivo* ne permet l'étude du réseau neuronal du striatum et son rôle dans la motricité.

Réduction. Nous analyserons nos données au fur et à mesure des expériences, permettant d'éviter les expériences inutiles. Si possible, nous appliquerons plusieurs protocoles par expérience, pour minimiser le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement. Avant toute chirurgie ou manipulation douloureuse, une combinaison d'anesthésique et sédatif sera administrée, ainsi qu'un analgésique en pré- et post-opératoire. Pendant l'intervention chirurgicale, la température corporelle de l'animal sera monitorée et régulée grâce à une sonde et un tapis chauffant. Au cours des expériences, les paramètres comportementaux et physiologiques des souris seront observés attentivement : fréquence cardiaque, posture de l'animal, réponses aux stimuli sensoriels. Le suivi sera effectué par l'analyse de leur aspect, de leur comportement et par la mesure de leur poids. Les souris auront une semaine pour se rétablir de la chirurgie avant de commencer toute manipulation et les animaux seront préalablement familiarisés avec l'expérimentateur.

11352 Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) sont des hémopathies malignes induites par la prolifération anormale et incontrôlée de cellules lymphoïdes T immatures. Malgré l'amélioration de la prise en charge des LAL, le devenir des patients atteints de LAL-T reste péjoratif avec environ 30% de rechute dans les deux années qui suivent le diagnostic. Un obstacle majeur dans la dissection moléculaire des processus tumoraux et de l'implémentation des thérapies « ciblées » associées, provient du fait que les LAL-T constituent un groupe de leucémies particulièrement hétérogène, dans lequel différents oncogènes sont activés dans des combinaisons diverses.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre l'oncogenèse des LAL-T en récapitulant chez la souris des réseaux oncogéniques. Pour cela nous utiliserons des souris génétiquement modifiées (KO, KO conditionnel, transgénique, reconstituée) permettant de mimer les LAL-T humaines. Par ailleurs, au cours de ce projet nous espérons mieux définir les oncogènes (ou gènes suppresseur de tumeur) qui sont essentiels dans le maintien des LAL-T et qui pourraient ainsi constituer des cibles thérapeutiques.

Pour ces souris, nous respecterons la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) afin d'optimiser leur utilisation et limiter leur souffrance :

-Remplacer. A ce jour l'étude *in vivo*, du développement leucémique nécessite le modèle animal. En effet les approches *in vitro* ou *ex vivo* ne peuvent pas récapituler la complexité de l'organisme. Le modèle murin a été choisi car il présente, d'un point de vu génétique, de grandes similitudes avec l'homme et ainsi les caractéristiques moléculaires des LAL-T chez la souris sont semblables à celles de l'homme.

-Réduire. Sur 5 ans notre estimation du nombre de souris utilisées est de 2040.

La plupart provient des accouplements de souris génétiquement modifiées susceptibles de générer des souris pouvant développer une tumeur (360 souris/an donc 1800 sur 5 ans). Quand cela est possible, des accouplements homozygotes sont réalisés pour éviter les procédures de génotypage (coupe de queue +marquage à l'oreille) et limiter la génération de souris qui ne sont pas d'intérêt et donc sont mises à mort.

Les 240 souris restantes seront utilisées dans le contexte d'expériences de transplantation (cellules génétiquement modifiées *ex vivo* puis réimplantées *in vivo* dans une souris receveuse).

-Raffiner. Les souris sont hébergées dans une animalerie de statut EOPS. Si on considère que le but de l'enrichissement est de faire diminuer le stress des animaux, alors on peut compter sur tout ce qui est déjà mis en œuvre dans ce sens dans l'animalerie (température régulée, Hygrométrie contrôlée, Calme des animaleries, Photopériode contrôlée.). Les procédures et la manipulation des souris sont réalisées par des personnes responsables et formées. Les souris (maximum 5 souris adultes/cage) sont hébergées dans des cages enrichies (coton/matériel pour confectionner des nids

& dôme) et elles sont surveillées quotidiennement. Le change des cages est réalisé de manière hebdomadaire. De plus nous limitons au maximum la manipulation des souris afin de réduire leur stress. Grâce à notre bonne connaissance de nos modèles murins nous avons établi une grille de critères permettant d'évaluer la douleur des souris ; cette grille définit également les points limites conduisant à l'euthanasie des souris. Il est important de noter que notre projet ne nécessite pas de conserver les souris en souffrance, ainsi dès que nous décelons l'apparition des premiers signes cliniques de la leucémie les souris sont euthanasiées pour analyse.

11353 Dans le contexte actuel de réduction de sucres dans les aliments ou les boissons (avec pour objectif notamment la diminution du risque de développement de l'obésité et du diabète de type 2), l'industrie agro-alimentaire essaie de trouver de nouvelles solutions apportant du goût sucré mais avec moins de calories ou un apport nutritionnel complémentaire comme les fibres par exemple.

Dans le cadre du développement de nouveaux produits, la mesure de la réponse glycémique en comparaison au glucose est une méthode indirecte pour vérifier que les nouveaux ingrédients (constitués de molécules de glucose reliées par différents types de liaison) sont entièrement ou au moins partiellement bien résistants à la digestion.

Dans ce projet nous comparerons l'index glycémique de différentes formulations afin de tester la digestibilité cinq ingrédients contenant des fibres avec celui d'une dose équivalente de glucose. Pour cela des souris seront gavées avec chacune des solutions à tester et les variations de glycémie seront mesurées post administration.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 12 souris mâles C57Bl6J âgées de 8 semaines.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 Rs :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution *in vitro* pour étudier la réponse glycémique suite à l'absorption orale d'une solution glucidique. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'être humain.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes et chaque individu sera son propre témoin.

Raffinement : l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de nid végétal. Afin de réduire le stress engendré par la procédure de gavage, les animaux seront habitués à ce geste pendant les jours précédant le premier test et les animaux seront manipulés fréquemment. Des points limites sont définis pour éviter toute souffrance éventuelle.

11354 Ce projet a pour but de déterminer l'effet d'ingrédients alimentaires d'origine végétale au niveau nutritionnel. Nous souhaitons d'une part tester leur efficacité sur le développement de maladies nutritionnellement induites et d'autre part évaluer leurs devenir métaboliques (absorption, fermentation colique, défécation ou excrétion).

Différentes maladies nutritionnelles sont au cœur de la stratégie de recherche de notre entreprise notamment l'obésité (induite par un régime hyperlipidique), l'hypercholestérolémie (induite par un régime hypercholestérolémique), le prédiabète (induit par un régime riche en carbohydrate ou en lipide) ou l'inflammation colique légère (induite par un régime hyperprotéique). Nous souhaiterions donc travailler avec des modèles nous permettant de déterminer l'influence de nos produits sur ces maladies. Aucun remplacement n'est possible pour les protocoles décrits dans ce projet car l'induction de maladies nutritionnelles constitue une réponse physiologique complexe qui ne peut pas être mimée *in-vitro* ou *ex-vivo*. Les différents ingrédients à tester sont choisis en fonction de la thématique (fibres solubles et/ou non-solubles dans le cas du prédiabète...). Les doses et les temps d'administration sont choisis en fonction de la littérature, par exemple, huit semaines de supplémentation à 5 ou 10% dans l'aliment pour voir l'effet d'ingrédients sur le développement de l'hypercholestérolémie.

Évaluer l'absorption, la fermentation colique, la défécation ou l'excrétion de nos produits est nécessaire afin de vérifier si des modifications de nos procédés ont pu entraîner des modifications

physiologiques ou métaboliques. Par exemple pour les fibres ou les polyols nous portons un intérêt aux paramètres de fermentation colique. En ce qui concerne les sucres rares, isomère d'autres sucres mais à faible pouvoir calorique, nous souhaitons déterminer leur devenir métabolique.

Les effectifs sont fixés de 10 à 12 animaux par groupe. Nous prévoyons d'impliquer un maximum de 420 rats, 252 souris et 252 hamsters par an soit 4620 animaux au maximum sur 5 ans. D'après la littérature, les réponses obtenues face à une maladie nutritionnellement induite sont des modulations de 20% des biomarqueurs choisis comme critère principal d'étude (cholestérol total dans le cas de l'hypercholestérolémie, cytokine de l'inflammation au niveau de la muqueuse colique ou glycémie à jeun dans le cas de l'étude du développement du prédiabète) (réduire). L'effectif de chaque groupe a donc été calculé pour assurer, dans la mesure du possible, la significativité statistique et pour limiter le nombre d'animaux utilisés (réduire). L'impact physiologique d'un dérèglement nutritionnel et le processus de métabolisation d'un ingrédient sont donc étudiés au travers de ce projet, aucune technique de remplacement n'est donc possible. Afin de limiter la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, ils sont placés à 2 par cage pour les rats et les hamsters et au maximum à 5 par cage pour les souris dans des conditions de stabulation classiques en dehors des périodes de procédure expérimentale, l'utilisation d'anesthésiants adéquats est mise en place lors des prélèvements sanguins, les animaux sont manipulés quotidiennement dans un environnement calme par du personnel formé (raffiner).

Les différentes études incluses dans ce projet pourront permettre de démontrer des bienfaits nutritionnels de nos produits tant dans le cadre de la prévention ou de la réduction de biomarqueurs symptomatiques de maladies ayant des origines nutritionnelles que de tester par exemple la fonctionnalité en fermentation de nos fibres. Ce projet préclinique sur animal nous permettra de cribler l'efficacité ainsi que de déterminer les doses efficaces de certains de nos ingrédients avant de d'envisager le stade clinique nécessaire à la construction d'un dossier EFSA pour l'obtention d'une allégation santé.

11355 CD31 est une protéine exprimée à la surface des cellules du sang et des vaisseaux. Elle a différentes fonctions selon les cellules qui l'expriment, et peut notamment délivrer un signal de survie aux cellules endothéliales (les cellules des vaisseaux sanguins) et bloquer l'activation des cellules du système immunitaire. Le rôle du CD31 a été étudié dans différentes pathologies inflammatoires (athérosclérose, anévrisme de l'aorte abdominale, arthrite rhumatoïde), et il a été montré que le CD31 possède des propriétés anti-inflammatoires et antiplaquettaires, en faisant une cible intéressante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. De plus, lorsque les cellules qui l'expriment s'activent, le CD31 est clivé et relargué dans le serum. Afin de développer des outils thérapeutiques, il est nécessaire de mieux comprendre le rôle du CD31 dans les différentes cellules qui l'expriment, ainsi que son mécanisme d'action. Dans les anévrismes de l'aorte abdominale par exemple, qui peuvent conduire à la mort suite à la rupture de l'anévrisme, il peut être difficile de détecter les sujets pour lesquels l'anévrisme risque de se rompre. Chez ces patients, la seule thérapie est la chirurgie afin de retirer l'anévrisme. Mieux disséquer le rôle du CD31 dans ce type de pathologie permettrait de mettre au point de nouveaux biomarqueurs permettent d'identifier les patients à risque de rupture (clivage du CD31 car les cellules endothéliales et les cellules du système immunitaire s'activent) et de nouvelles stratégies thérapeutiques (rétablissement de la signalisation inhibitrice du CD31 par exemple) en vue de retarder le besoin de recourir à la chirurgie.

Le CD31 peut exercer ces fonctions de différentes façons : soit en agissant comme une molécule permettant d'augmenter l'adhésion entre les cellules, soit en agissant comme un récepteur dont l'engagement induit une voie de signalisation inhibitrice dans la cellule. Cette fonction inhibitrice dépend de motifs particuliers présents dans la protéine CD31. Afin de mieux comprendre l'importance de la fonction inhibitrice par rapport à la fonction d'adhésion du CD31 *in vivo*, nous allons développer un nouveau modèle de souris transgénique auquel manque ces motifs. Ce modèle nous permettra de tester l'implication des motifs inhibiteurs du CD31 dans différentes pathologies *in vivo*. Le but de ce projet est de caractériser ces nouvelles souris, et de tester si elles ont ou non un phénotype dommageable. Pour cela, des animaux seront suivis de leur naissance

jusqu'à l'âge de 12 semaines de façon au moins deux fois par semaine afin de surveiller l'apparition éventuelle de points limites (perte de poids, agressivité, prostration, poil hérissé, dos rond) afin d'établir un scoring. En cas d'un scoring de 2, un analgésique sera administré aux animaux. Si l'état des animaux ne s'améliore pas dans les 3 jours suivants, les animaux seront euthanasiés. En cas d'un scoring de 3 ou plus, ou à l'âge de 12 semaines, les animaux seront euthanasiés. Un scoring adapté a été établi pour les souris. Nous analyserons également l'effet de la mutation du CD31 sur le phénotype des souris, notamment des cellules endothéliales et des cellules du système immunitaire. Dans ce but, les souris seront mises à mort à l'âge de 12 semaines par exsanguination sous anesthésie générale, puis perfusées afin de pouvoir caractériser les cellules du sang et de différents organes. Le phénotype des souris mutantes pour le CD31 sera comparé à celui de souris normales, et de souris ayant une déficience complète en CD31, qui ne présente pas de phénotype dommageable.

Ce projet est fondé sur la règle des 3R. Le CD31 est impliqué dans des pathologies complexes faisant intervenir de nombreux types cellulaires, et l'étude de l'impact du CD31 dans ces pathologies ne peut donc se faire que sur des organismes vivants, ayant un système immunitaire proche de l'homme, comme les souris, et rendant le remplacement par des expériences *in vitro* impossible et le développement de modèles animaux essentiel. Afin de minimiser le nombre d'animaux, une étude statistique a été réalisée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires. Ce projet va nécessiter l'utilisation d'environ 128 souris pour une durée maximale de 3 ans. Des mesures (enrichissement des cages, pas d'isolement, anesthésie lors du prélèvement sanguin etc.) ont été prise afin d'améliorer le bien-être des animaux avant, pendant et après chaque expérience. Des points limites, décrits plus haut, ont été établi afin d'intégrer au maximum la préconisation des 3 R.

11356 La stratégie de recherche sur les maladies neurodégénératives (MNDs), dont les plus communes sont les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, est une priorité sociétale et présente différents buts (améliorer le diagnostic, la qualité de vie, la prise en charge et développer la recherche fondamentale et appliquée).

Notre objectif principal est de retarder ou d'enrayer la progression clinique de ces maladies en empêchant ou en inversant les mécanismes physiopathologiques de dépôts diffus ou localisés (exemple dépôts amyloïdes) imputés aux lésions du système nerveux central. Nous avons développé une approche thérapeutique nouvelle pour extraire de manière sélective des ions participant à la composition de ces dépôts considérés comme toxiques.

En amont du développement préclinique de notre étude et afin de respecter la règle des « 3 R », nous avons choisi plusieurs méthodes alternatives (physico-chimiques et *in vitro*) pour optimiser de manière exhaustive les différents paramètres intervenant dans notre protocole. Cette étape essentielle nous permet à la fois de REMPLACER le modèle animal et aussi de REDUIRE au minimum leur nombre pour la démonstration de la faisabilité de notre projet en préclinique.

Notre projet nécessitera 152 rats maximum sur une durée de 4 ans. L'étude impliquera trois procédures et cinq sections nécessaires pour implémenter, démontrer la preuve de concept, étudier la biodisponibilité des paramètres étudiés, établir l'innocuité de notre protocole au sein du système nerveux central en condition non pathologique, et valider le protocole sur une seconde souche de rat. Dans un souci de RAFFINEMENT, chaque procédure chirurgicale pouvant impliquer un stress ou une douleur sera réalisée sous anesthésie. Dès qu'un point limite ou la fin de l'étude sera atteint l'euthanasie sera effectuée selon les méthodes autorisées par la législation. De plus, chaque animal sera pris en charge et suivi de manière quotidienne afin d'évaluer son bien-être et sera soumis périodiquement à des séances de renforcement positif comportemental.

11357 Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche d'un traitement contre différents cancers. De nombreux progrès ont été réalisés ces dernières années en termes de thérapie en particulier avec les thérapies ciblées mais il reste encore beaucoup de cancers n'ayant pas de solution thérapeutique. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre projet. Il consiste à greffer des cellules cancéreuses à des souris ayant un système immunitaire fonctionnel afin de permettre le développement de tumeur sous la peau des animaux. Ces tumeurs obtenues sont ainsi facilement

mesurables et l'évolution de leur croissance pourra être mesurée, au cours du temps, sans avoir à euthanasier l'animal ou à utiliser une méthode invasive, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux requis pour ces travaux de recherche. Tout d'abord, nous effectuerons des expériences de mise au point (procédure expérimentale n°1) afin de déterminer le nombre de cellules cancéreuses à greffer nécessaire et le nombre de jours entre la greffe et le moment où les animaux pourront commencer à être traités.

Dans une 2ème phase (procédure expérimentale n°2), les souris seront greffées et traitées par injection intra-péritonéale de thérapie ciblée (anticorps thérapeutique), seul ou en combinaison, durant 1,5 mois. Nous testerons 3 lignées de cellules cancéreuses (visant 3 types de cancers différents) et 3 combinaisons de thérapie ciblée différentes. L'effet de ces thérapies sur certains marqueurs tumoraux présents dans la tumeur sera observé au bout d'une semaine de traitement.

2295 souris maximum seront nécessaires pour ce projet sur 5 ans.

L'utilisation d'animaux dans la recherche en oncologie est nécessaire car elle permet d'étudier de manière efficace l'effet des traitements à la fois sur la croissance tumorale et sur la récurrence tumorale.

Ces deux paramètres peuvent être évalués chez l'animal en mesurant des tumeurs, il n'est pas possible d'évaluer ces paramètres sur des cellules en culture. A l'heure actuelle les méthodes *in vitro* ne permettent pas de mimer la complexité du système vivo en cas de cancer tel que la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins ou le recrutement des cellules du système immunitaire, etc. Par conséquent, nous ne pouvons pas remplacer les animaux par d'autres techniques.

Le nombre de souris que nous utiliserons est justifié à la fois d'un point de vue technique (plusieurs protocoles développés et nécessité statistique) et scientifique car le produit testé pourrait passer en étude clinique si les résultats de ces études sont positifs. Enfin le bien-être des souris sera évalué tout le long de l'étude. Le raffinement des conditions d'hébergement sera appliqué car les animaux profiteront d'un enrichissement de leurs conditions de vie leur permettant de faire un nid ce qui contribue à leur bien-être. Des signes de stress ou de souffrance de l'animal (perte de poids supérieure à 20%, présence de sang dans les selles, piloérection, prostration...) ainsi qu'un volume trop important de la tumeur, pouvant conduire à une gêne ou une douleur pour l'animal, conduiront à son euthanasie.

11358 La trisomie 21 (T21), aussi appelée Syndrome de Down (SD), due à la présence d'un chromosome 21 supplémentaire, est la forme la plus fréquente de retard mental qui touche environ 1 nouveau-né pour 2000 naissances. Elle représente environ un tiers des déficiences intellectuelles chez les enfants d'âge scolaire. Arriver à déplacer de quelques dizaines de points le quotient intellectuel des patients T21 leur permettrait d'avoir une vie plus autonome et socialement intégrée et constituerait un progrès très important pour la qualité de vie des patients et de leur entourage. La finalité de la recherche sur la T21 est donc de parvenir à mettre au point un traitement améliorant, puis normalisant, les fonctions intellectuelles des malades.

Plusieurs traitements ont déjà montré des effets bénéfiques chez la souris et chez l'homme. Parmi eux, une approche visant à réduire l'activité d'une protéine kinase, qui est suractivée chez les porteurs de trisomie. Cette suractivité, due à sa présence en 3 copies au lieu de 2, serait responsable en grande partie des déficits cognitifs observés chez les patients. La réduction de son activité à l'âge adulte a montré des effets bénéfiques dans des modèles animaux mais aussi chez l'homme. Pour autant, peu d'études portant sur l'impact d'un traitement *in utero* ont été réalisées chez le modèle animal, alors que des modifications structurales de l'hippocampe et du cervelet (2 zones du cerveau) se mettent en place très tôt au cours du développement embryonnaire et donc au cours de la période gestationnelle. Un traitement précoce, qui modifierait ces anomalies au plus tôt, devrait avoir un impact très positif sur les patients. Les résultats devraient également permettre d'approfondir les connaissances sur le rôle de cette protéine kinase au cours du développement et son impact sur les défauts cognitifs des patients. Nous avons réalisé une première étude avec l'administration d'un inhibiteur à large spectre, durant la gestation, qui nous a permis d'obtenir des

résultats prometteurs. Toutefois, bien que le mode d'administration de cet inhibiteur soit facile, il comporte plusieurs inconvénients, comme une disponibilité très faible et un champ d'action très large, ce qui complique l'interprétation. C'est pourquoi nous nous proposons pour cette nouvelle étude, d'utiliser un inhibiteur plus spécifique, isolé à partir d'une éponge marine et qui a déjà montré des effets bénéfiques chez l'adulte, lors de l'administration chez 2 modèles murins de la T21.

Pour débiter, nous étudierons le passage de la molécule dans le plasma et dans le cerveau et son temps d'élimination, dans des embryons juste avant la naissance, après une seule injection de la mère. Pour cela, un groupe de 18 femelles gestantes, sans aucune modifications génétiques, sera utilisé pour produire ces animaux.

Ensuite, nous utiliserons 2 modèles murins pour la trisomie 21. Des femelles sans modifications génétiques seront accouplées avec des mâles porteurs de trisomie. Ensuite les souris femelles gestantes seront injectées en sous cutané au niveau du cou, tous les jours, avec l'inhibiteur de la protéine, qui diminuera son activité au cours de la période gestationnelle. Après 18,5 jours de gestation, les embryons seront isolés en vue d'études moléculaires, physiologiques et histologiques, juste avant la naissance. Ces études permettront de mesurer l'impact du traitement au cours du développement.

Règle des 3R :

Remplacement : La compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires ainsi que les origines développementales des pathologies génétiques associées à des retards mentaux requièrent l'étude d'un organisme vivant dans son intégrité et sa globalité et il n'existe donc pas de méthode autre que l'étude *in vivo*. La souris est une espèce physiologiquement et génétiquement proche de l'Homme dans laquelle nous pouvons réaliser les manipulations génétiques pour obtenir ces modèles de pathologies humaines.

Réduction : Nos expériences moléculaires, physiologiques et histologiques de base, réalisées juste avant la naissance, sont construites sur des groupes de 6 animaux pour avoir un résultat significatif, en condition traitée ou non traitée. La taille des groupes a été déterminée grâce aux résultats d'une première étude, menée avec un inhibiteur à large spectre. Cette étude nous a permis de déterminer le nombre minimum d'animaux utilisés, soit 6 par groupe pour pouvoir utiliser une statistique éprouvée.

Raffinement : Le taux de transmission de la trisomie des modèles souris est d'à peine 30%. 1 portée compte en moyenne 6 petits dont 2 trisomiques. Pour assurer la production de 4 groupes : 6 contrôles non traités, 6 contrôles traités, 6 trisomiques non traités et 6 trisomiques traités, il faut accoupler 6 femelles par modèle expérimental. Comme nous avons 2 conditions expérimentales (2 modèles murins de trisomie 21), cela fait 12 animaux femelles utilisés au total par étude. Nous avons 3 études différentes (moléculaire, histologique et physiologique) donc 36 animaux auquel il faut rajouter les 18 femelles gestantes sans modifications génétiques pour l'étude du passage et de l'élimination de l'inhibiteur, soit 54 femelles gestantes au total. Pour tenir compte des 20% de femelles qui ne présentent pas de gestation après accouplement, ce nombre sera porté à 66.

L'administration chez l'adulte de cet inhibiteur en injection intra péritonéale, sur une période de 19 jours consécutifs, n'a pas montré d'effets délétères chez les animaux traités, même chez les contrôles. L'effet attendu est un bénéfice chez les animaux porteurs de trisomie. Toutefois, un suivi des animaux durant la période gestationnelle sera réalisé et un arbre décisionnel basé sur le reflet de la douleur chez la souris sera utilisé pour ne pas prolonger les souffrances éventuellement constatées. Les conditions d'élevage seront améliorées pour les femelles gestantes par l'apport de matériel leur permettant de faire un nid.

11359 Dans le monde, le nombre de patients atteints d'une maladie neurodégénérative (comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson), ou psychiatrique (comme la schizophrénie et la dépression), est estimé proche du milliard. L'allongement de la durée de vie est un facteur majeur d'augmentation de ce nombre. Le retentissement social pour les patients et leurs familles est considérable en raison des handicaps moteurs, intellectuels et psychiques qui en résultent.

Ces maladies se traduisent par des altérations neurologiques complexes associées à des symptômes comportementaux pouvant être reproduits en partie chez la souris à la suite d'une altération de son génome, d'une modification de son environnement, ou encore en lui administrant des agents chimiques ou des préparations biologiques destinées à modifier le fonctionnement du système nerveux. Ces souris sont des modèles précliniques à forte valeur translationnelle à l'homme, qui permettent l'identification de nouveaux bio-marqueurs et de nouvelles cibles qui contribuent au développement de meilleurs traitements pour ces pathologies.

Ce projet a les objectifs successifs suivants :

- 1) Induire des modèles de pathologies neuropsychiatriques chez la souris.
- 2) Pour chaque modèle, caractériser le degré d'atteinte fonctionnelle sur le plan comportemental, immuno-histologique ou biochimique.
- 3) Démontrer qu'il est possible de réduire ces signes de pathologie neuropsychiatrique ou de ralentir leur apparition en administrant aux animaux des molécules de référence non commercialisées mais dont le profil pharmacologique est connu (phase de validation pharmacologique du modèle).
- 4) Sélectionner nos meilleurs traitements pharmacologiques (préalablement testés par des approches *in vitro*) en termes d'efficacité et de sécurité, et pouvant être évalués ensuite chez l'homme.

Les phases 2) et 3) permettront d'appréhender le nombre et la constitution des groupes d'animaux qui seront nécessaires pour la phase 4). Autrement dit, aucun animal ne sera utilisé pour des études d'efficacité si le modèle n'est pas validé préalablement sur le plan comportemental et/ou biochimique et/ou immuno-histologique.

Certaines études biochimiques ou immunohistologiques pourront être conduites sans test comportemental préalable. Cependant, dans un souci de réduire le nombre d'animaux utilisés, les études comportementales seront presque toujours suivies de mesures biochimiques et/ou immunohistologiques.

Au total, compte-tenu de la variété des techniques d'induction de modèle pour mimer les pathologies humaines, du nombre de mesures comportementales, histologiques ou biochimiques envisagées, du nombre de cibles thérapeutiques qui seront étudiées, et de la nature de ces cibles (impliquées dans des maladies neurodégénératives ou psychiatriques), l'estimation du nombre de souris nécessaires sur les cinq années prévues pour ce projet est de 14000.

Le but ultime du projet est de trouver des traitements pharmacologiques efficaces sur les pathologies du système nerveux. Cette efficacité ne peut être vérifiée que sur l'animal. La souris comme le rat est une espèce adaptée car son génome, sa physiologie et son répertoire comportemental se rapprochent de ceux de l'homme. De plus, ce sont deux espèces pour lesquelles la communauté scientifique dispose de nombreuses données sur le registre comportemental. Par contre, comparativement au rat, la souris offre une plus large palette de modèles de pathologies du système nerveux. En effet, les modèles « souris » induits par utilisation d'agents biologiques ou par modifications génétiques sont plus largement développés par la communauté scientifique que les modèles « rats ».

Toutes les souris de ce projet feront l'objet d'un suivi quotidien réalisé par les expérimentateurs et le personnel assurant leur soin. Ce suivi permettra d'identifier tout signe de souffrance et de soustraire les animaux des études en cas d'atteinte des points limites définis. Il sera accru pour les lignées de souris génétiquement altérées susceptibles de présenter un phénotype dommageable. Les animaux disposeront de tubes de coton 'cocoon' pour se construire un nid ou de morceau de bois à ronger dans leur cage d'hébergement.

Les phases de chirurgie nécessaires à certaines inductions de modèles ou traitements pharmacologiques seront réalisées sous couverture anesthésique et analgésique. Ils seront remis en groupe dès que possible en post opératoire afin d'éviter le stress de l'isolement, et leur surveillance sera renforcée. Certains tests comportementaux étant susceptibles d'engendrer un stress mineur pour l'animal, souvent lié à la nouveauté de la situation ou à l'isolement, nous envisageons alors qu'ils soient de courte durée pour stopper rapidement la source de stress.

Pour chaque étude, lorsque suffisamment de données pharmacologiques seront réunies, une consultation statistique sera programmée pour réajuster le nombre d'animaux nécessaire, soit parce que l'étude est nouvelle, soit parce que le nombre d'animaux pour cette étude a été évalué depuis longtemps.

11360 Nos projets sont centrés sur les processus de réparation du foie et de régulation de la sécrétion biliaire. La régénération du foie est indispensable à la guérison après hépatite sévère ou après ablation chirurgicale d'une partie du foie, mais aussi au cours de maladies du foie plus rares touchant le système biliaire et entraînant progressivement une cirrhose. L'étude des mécanismes qui gouvernent la régénération et la sécrétion biliaire permettra de progresser dans le traitement des maladies aiguës et chroniques du foie, en particulier celles touchant le système biliaire. Ces processus très complexes impliquent une multitude de voies de signalisation et d'interactions cellulaires. Nous nous intéressons en particulier aux voies de signalisation impliquant le récepteur membranaire des acides biliaires. L'ensemble de nos travaux nécessite la mise en place de modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro* permettant d'étudier les différents facteurs régulant la réparation du tissu hépatique, parmi lesquels les acides biliaires occupent une place importante. Les modèles expérimentaux *in vivo* les plus utilisés dans notre équipe (comme dans la littérature) pour étudier la réparation du foie chez la souris, sont l'hépatectomie partielle (ablation d'une partie du foie), l'induction de l'équivalent d'une hépatite, et la ligature de la voie biliaire, sur une échelle de temps allant de quelques heures à 5 jours. Pour étudier la réparation chronique (développement de l'équivalent d'une cirrhose), sur une échelle de temps plus étirée (plusieurs semaines), nous réalisons également des ligatures de la voie biliaire et des traitements induisant l'équivalent d'une hépatite chronique. L'ensemble de ces procédures ont été autorisées dans un projet précédent ("Régulation de la réparation du foie par la signalisation purinergique et par les acides biliaires."). Le présent projet complètera le précédent en étudiant plus spécifiquement le rôle du récepteur membranaire des acides biliaires ("TGR5") dans des modèles expérimentaux de maladie aiguë ou chronique du système biliaire. Notre objectif est d'apporter des données scientifiques identifiant le récepteur des acides biliaires comme cible thérapeutique potentielle au cours des atteintes biliaires. Nous disposons actuellement de souches de souris génétiquement modifiées, déficientes pour les récepteurs membranaires que nous voulons étudier. Le déficit de ces récepteurs n'induit aucune anomalie spontanée ni souffrance chez les souris, mais nous étudions l'impact de ces récepteurs sur la réparation du foie et la sécrétion biliaire dans nos différents modèles expérimentaux. Nous élevons aussi une souche de souris sauvages "contrôles". Ces souris sont indispensables à nos travaux, pour l'étude *in vivo* de la réparation du foie, ainsi que pour l'isolement des différentes cellules hépatiques ou extra-hépatiques et leur étude *in vitro*. Le caractère par définition intégré des processus que nous étudions ne permet pas le remplacement complet des modèles *in vivo* par des modèles *in vitro* qui ont cependant un caractère complémentaire indispensable à la compréhension fine des mécanismes que nous étudions. Les expériences *in vitro* sont pratiquées systématiquement à chaque fois qu'elles peuvent remplacer les expériences *in vivo*. Durant l'ensemble de nos études, nous nous efforçons de réduire le nombre d'animaux nécessaires et suffisants dans chaque groupe expérimental. Compte tenu de la variation « inter-animale » des réponses biologiques impliquées au cours des processus de régénération et de réparation du foie dans les modèles étudiés, un nombre optimal de 6 souris par groupe expérimental doit être, dans la plupart des cas, prévu. Notre recul ainsi que la littérature de notre domaine montrent que toute réduction de ce nombre produit des données dont l'analyse n'est pas solide. Nous optimisons l'étude des souris en cours et en fin d'expérimentation (multiples prélèvements d'organes et de fluides) de façon à ne pas répéter inutilement les expériences. Le raffinement de nos procédures consiste à : réaliser toutes nos expériences avec le souci permanent de limiter le plus possible la douleur ou l'inconfort des souris (notamment procédures d'anesthésie et d'euthanasie bien maîtrisées et antérieurement validées par le comité d'éthique, définition précise des points limites). Le nombre total de souris utilisées dans ce projet complémentaire de notre projet antérieurement validé est estimé à 230, réparties dans des protocoles utilisant les différentes procédures.

11361 La migraine chronique, encore de nos jours, ne bénéficie pas de traitements pour réduire de façon significative les handicaps associés. La migraine se caractérise par des crises à hautes fréquences de céphalées accompagnées de nausées et d'une hypersensibilisation à de nombreux stimuli (olfactifs, visuels, auditifs). Un des symptômes les plus handicapant pour le patient est l'hypersensibilité mécanique ou allodynie (stimulus mécanique léger comme le toucher ressenti comme une douleur) qui constitue un marqueur de progression de la migraine vers le stade chronique. Nous savons que les astrocytes (cellules nerveuses qui collaborent avec les neurones) sont significativement impliqués dans la modulation des messages nociceptifs notamment dans l'allodynie mécanique. Afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans la migraine, il apparaît donc nécessaire de savoir si les astrocytes jouent un rôle majeur dans ses mécanismes physiopathologiques. Sachant qu'il n'existe objectivement aucune méthode alternative pour ce type d'étude, nous proposons d'étudier l'implication de l'activité des astrocytes dans un modèle animal (rat) de migraine où l'allodynie est déclenchée par administration répétée (1 injection / jour/ 5 jours) d'un vasodilatateur, l'isosorbide dinitrate (ISDN) connu chez l'homme pour déclencher des crises de migraine.

Le but de ce travail est de mesurer sur tissu (coupe d'encéphale), via une approche immunohistochimique, les variations d'expression de marqueurs d'activité neuronale et astrocytaire induites par l'ISDN répété.

Pour ce faire, au bout de 5 jours d'ISDN (ou de sérum physiologique témoin), les rats (mâles et femelles) seront anesthésiés et soumis (ou non) à des stimulations mécaniques de la face (stimulation tactile avec un filament de von frey de 6 grammes pendant 3 minutes). Après ces stimulations, les animaux seront euthanasiés et les cerveaux prélevés pour la réalisation de coupes histologiques et des marquages par anticorps des marqueurs d'activité. Le nombre de groupe de rats et le nombre de rats par groupe est réduite au maximum tout en préservant une puissance statistique significative. Ainsi, nous utiliserons 4 groupes de rats mâles et 4 groupes femelles (n=6 /groupe) soit au total 48 rats. Pour chaque sexe il y aura 2 groupes constitués par des animaux ayant reçu l'ISDN avec ou sans stimulation mécanique, et 2 groupes équivalents (stimulés ou non stimulés) avec administration de sérum physiologique. Si notre hypothèse est vraie, les résultats (via une analyse statistique non paramétrique) montreront une augmentation du marquage astrocytaire chez les animaux ISDN stimulés par rapport aux animaux ISDN non stimulés et/ ou témoins ce qui attesterait de façon originale de l'implication de l'activité astrocytaire dans la migraine chronique.

Dans le respect du "R "de Raffiner, il est à noter que nos animaux sont sous anesthésie générale lors des stimulations mécaniques. Concernant les périodes des 5 jours pendant lesquelles les animaux reçoivent les injections répétées (1/jour) d'ISDN, les animaux sont hébergés dans des cages standards bénéficiant d'un enrichissement social et environnemental adapté avec visites quotidiennes. De plus les animaux sont manipulés lors des séances de vérification de l'installation de l'allodynie qui est mesurée par l'application de fins filaments plastiques, calibrés en force, sur la face pendant 3 sec. La mesure consiste à déterminer quel est le filament le plus faible en force capable de déclencher un réflexe de retrait (nociceptif) de la face. Ainsi les animaux sont soumis à de très faibles stimulations nociceptives tant en durée qu'en intensité et auxquelles ils peuvent se soustraire facilement. L'expérience du présent modèle de migraine montre que les animaux ne présentent jamais de problème liés aux injections et au développement de l'allodynie mécanique qui pourraient altérer leurs besoins physiologiques et sociaux (la prise de poids, la motricité, les relations sociales restent normales).

11362 L'ostéoporose est une maladie qui fragilise les os, fréquente chez les femmes après la ménopause, mais qui peut également survenir chez des patients plus jeunes ou chez l'homme. Dans ce cas, elle est le plus souvent la conséquence d'une autre pathologie, de la prise de médicaments ou de toxiques. L'ostéoporose se traduit par une densité minérale de l'os faible, avec un risque accru de fracture. Elle résulte d'un déséquilibre entre la formation et la destruction (ou résorption) de l'os. Du fait d'un mécanisme de couplage entre la formation et la résorption osseuse, qui conduit au remodelage de l'os, la majorité des traitements de l'ostéoporose qui bloquent la résorption bloquent

également la formation osseuse. Il existe un réel besoin de traitements anti-ostéoporotiques qui stimulent la formation osseuse. Dans cette optique, il semble naturel de s'intéresser à la voie Wnt, un acteur clé de la formation osseuse. Il s'agit d'une voie de signalisation cellulaire, qui permet la transmission d'un message à l'intérieur de la cellule pour moduler son action. Lorsque la protéine Wnt se fixe à ses récepteurs à la surface cellulaire (appelés LRP5 et Frizzled notamment), cela aboutit à l'activation de gènes impliqués dans la formation osseuse. L'absence ou le blocage de cette voie de signalisation induit donc une diminution de la formation osseuse. Cependant, de nombreux points restent à éclaircir concernant la régulation osseuse par la voie Wnt.

Chez l'homme, des mutations de LRP5 (récepteur à la surface cellulaire de la protéine Wnt) ont été identifiées, notamment une mutation appelée p. Val667Met, que l'on trouve dans un syndrome appelé Ostéoporose pseudogliome (OPPG), caractérisé notamment par une ostéoporose sévère et une atteinte oculaire, mais qui a aussi été décelée chez des hommes jeunes atteints d'ostéoporose sans cause retrouvée. Nous avons constitué une cohorte de patients jeunes ostéoporotiques et avons pu constater que l'on trouve cette mutation à une fréquence plus élevée chez ces patients que dans la population générale. D'autres mutations de LRP5 ont également été détectées chez ces patients. Nous avons donc formulé l'hypothèse que la mutation p. Val667Met pourrait expliquer en grande partie l'ostéoporose chez ces patients jeunes, et pourrait avoir une influence sur la façon dont ils vont répondre aux traitements anti-ostéoporotiques. Par ailleurs, le phénotype oculaire n'a jamais été évalué dans ce contexte, alors que des mutations de Lrp5 sont décrites dans des pathologies oculaires ainsi que dans l'OPPG.

L'objectif principal de cette étude est de caractériser l'effet de cette mutation sur l'os et les yeux. Comme la mutation touche un récepteur impliqué dans la voie Wnt, nous chercherons à déterminer :

- comment fonctionne la voie Wnt en présence de cette mutation et quel effet on obtient sur la formation et la résorption de l'os, ainsi que sur le développement de la rétine
- quel est l'impact de cette mutation lors d'un traitement anti-ostéoporotique qui bloque un inhibiteur de la voie Wnt appelé sclérostine afin de stimuler la formation de l'os
- l'impact de l'association de cette mutation avec d'autres mutations identifiées dans notre cohorte de jeunes patients ostéoporotiques.

Nous chercherons les réponses à ces questions grâce à des expériences de culture cellulaire, mais également grâce à un modèle de souris qui porte la mutation décrite chez l'homme. En effet, les expériences *in vitro* ne permettent pas de mimer de façon satisfaisante le remodelage osseux en raison de multiples interactions cellulaires et tissulaires, et de l'influence de la composante mécanique, hormonale et du vieillissement intervenant dans l'ostéoporose. L'expérimentation animale a été conçue afin de respecter la règle des 3R. Le nombre de souris sera réduit au minimum nécessaire (au maximum, 254 souris seront nécessaires). Ce nombre a été calculé afin de pouvoir observer des différences significatives lors des procédures, selon les données de la littérature et l'effet des procédures attendues. Un maximum d'information sera récupéré par animal (prélèvements de différents os, de sang, d'urines, des yeux) afin de pouvoir répondre aux différentes questions qui se poseront lors de l'étude tout en limitant le nombre d'animaux. De même, plusieurs procédures seront réalisées sur les mêmes animaux (examens oculaires, mesure de densité minérale osseuse et phénotypage suite à l'euthanasie). Les animaux seront maintenus par groupe de 5 par cage, nourris *ad libitum*, dans un environnement enrichi (matériel pour nidification). Ils seront suivis de façon rapprochée suite aux procédures, tout comportement associé à un malaise de la souris (prostration, modification du comportement, poils hérissés et ternes, hypoactivité, prostration, vocalisations, boitement) ainsi que des signes locaux d'inflammation (œdème, induration) seront recherchés et consignés. Si nécessaire, des injections d'antalgique par voie sous-cutanée (Buprénorphine à la dose de 50 µg /kg) ainsi que l'installation de nourriture plus accessible seront mises en place. Si ces signes persistent et que l'animal perd 20% de son poids malgré les traitements antalgiques dans les 72h, il sera alors retiré de l'expérimentation et euthanasié afin d'éviter la souffrance.

Ce projet permettra de mieux comprendre comment la mutation p. Val667Met influe sur la résistance osseuse mais également d'obtenir des enseignements sur le fonctionnement de la voie Wnt, qui a

un rôle majeur dans la formation osseuse. Il permettra également de déterminer si une altération de celle-ci peut modifier la réponse au traitement anti-ostéoporotique, notamment au traitement qui bloque la sclérostine. Cela pourra faciliter une prise en charge plus précise de l'ostéoporose et une meilleure adaptation des traitements.

11363 Les trichostrongles impactent significativement la santé animale puisqu'ils sont responsables de symptômes cliniques de type perte de poids, anémie, diarrhée voire la mort des animaux les plus atteints. Ces parasites sont responsables de pertes économiques importantes dans de nombreuses espèces de rente, notamment parce que chaque année, des milliards d'euros sont dépensés pour les contrôler. L'utilisation massive de vermifuges a conduit à l'apparition de vers résistants aux traitements et rend actuellement le contrôle de ce parasite relativement limité. La mise au point de nouvelles méthodes de contrôles devient alors un besoin urgent pour les différentes filières de productions animales. Pour cela, nous développons des projets de recherche qui visent à mieux comprendre la biologie du parasite ainsi que les mécanismes impliqués dans l'apparition de vers résistants. Nous évaluons également l'effet antiparasitaire de produits naturels.

Tous nos tests se focalisent en première intention sur les stades libres de ces parasites (œufs ou larves infestantes), qui sont les seuls que nous puissions étudier par des méthodes *in vitro*. Cette approche permet de ne pas d'euthanasier les hôtes infestés (moutons, ovins) et de générer le matériel biologique de base dont nous avons besoin. La production de ces larves nécessite d'infester des ovins âgés de 3 mois par administration d'une dose infestante de larves et de collecter les matières fécales dont nous extrayons les stades parasitaires d'intérêt.

Remplacement : ce ver est un parasite obligatoire et nous ne pouvons pas le multiplier en système artificiel sans faire intervenir l'hôte (pas de remplacement possible).

Réduction : nous utilisons un minimum d'animaux et cultivons une grande quantité de matières fécales pour obtenir le matériel biologique en quantité suffisante pour nos analyses. En fin de protocole, les animaux seront euthanasiés et les vers adultes collectés pour mener des analyses de biologie moléculaire.

Raffinement : les animaux seront maintenus en bergerie tant que les parasites n'émettent pas d'œufs (20 à 30 jours après infestation) puis seront maintenus en cages par deux pendant 60 jours maximum. Dans les deux conditions, les animaux auront un enrichissement social : ils seront au minimum deux et pourront avoir un contact physique ou visuel permanent. Les animaux sont observés quotidiennement. Dans le cas où l'animal présenterait un état clinique détérioré (apathie, anorexie, diarrhée), une coproscopie de contrôle sera réalisée. Tout animal présentant une coproscopie supérieure à 10000 œufs/g et non infesté par *Haemonchus contortus* sera vermifuge.

Au total, cette saisine concernera 55 ovins sur 5 ans qui permettront d'évaluer de nombreux antiparasitaires d'origine naturelle, de comprendre la résistance de ces parasites ou de développer des stratégies vaccinales.

11364 Le projet porte sur la compréhension des mécanismes responsables de la dégénérescence des valves cardiaques et plus précisément de la valve mitrale. Il s'agit ici d'améliorer les connaissances fondamentales sur cette pathologie mais aussi de proposer un nouveau traitement médicamenteux pour une maladie très fréquente où seul le traitement chirurgical est possible. Ainsi on pourrait ralentir le développement de la maladie mais aussi proposer un moyen de stabiliser sa progression chez des malades inopérables. Dans le cas présent, il s'agit de développer un traitement pour des malades ayant une dégénérescence mitrale due à une anomalie génétique, le prolapsus mitral lié au chromosome X. On se propose de ralentir la dégénérescence congénitale en bloquant des récepteurs de la sérotonine et du système rénine/angiotensine/aldostérone. Ce travail sera réalisé chez des rats porteurs de la mutation la plus fréquemment rencontrée chez l'Homme (FLNA-P637Q). Ils seront traités par les produits d'intérêt et l'évolution de la maladie sera suivie en échocardiographie. En fin de protocole nous pratiquerons des analyses sanguines et étudierons les valves en histologie. L'atteinte dégénérative mitrale présentée par ces animaux n'affecte pas leur statut fonctionnel cardiovasculaire au stade où ils seront étudiés. Remplacer : le recours aux animaux est ici indispensable car nous avons montré que le système biologique conduisant à la

dégénérescence valvulaire implique plusieurs tissus (cœur et moelle osseuse) et plusieurs types cellulaires dont certains ne sont pas dans les valves. Nous menons aussi en parallèle des études moléculaires sur des cellules en culture permettant de remplacer des expériences animales. Réduire : nous limitons le nombre d'animaux utilisés en procédant à un suivi longitudinal des animaux par un examen non invasif (échographie). Cela évite de prélever des animaux aux différents points de mesure et d'augmenter la puissance statistique en permettant des comparaisons intra-individuelles. Le nombre d'animaux par groupe est basé sur la puissance statistique requise et calculé à partir de nos études précédentes chez la souris dans d'autres modèles. Seulement les mâles seront utilisés dans ce projet, compte tenu de la localisation de la mutation (chromosome X). Ceci nous conduit à un effectif de 120 animaux, dont 100 pour les expérimentations et 20 (15 femelles et 5 mâles) pour le maintien de la lignée. Raffiner : dans ce projet, les conditions d'hébergement sont standardisées au sein d'une animalerie centrale conventionnée et permettent de réduire le stress des animaux (enrichissement du milieu par bâtons type « aspen bricks » à ronger, hébergement en groupes, taille des cages sans dépasser 2-3 rats par cage). Les animaux sont surveillés quotidiennement par du personnel qualifié. Le stress lié à la prise de pression à la queue ou aux prélèvements sanguins sera limité par une acclimatation des animaux à l'espace de contention, l'échocardiographie sera réalisée sous anesthésie (isoflurane). L'administration des traitements se fera par mini-pompes osmotiques (voie sous-cutanée) pour réduire le stress lié aux injections quotidiennes. Toutes les interventions seront réalisées sous anesthésie et analgésie. A chaque étape du projet où cela est possible, la méthode la moins invasive pour l'animal sera privilégiée.

11365 Nous souhaitons analyser et comprendre comment les malformations/anomalies à l'origine des pathologies neurodéveloppementales sont générées ainsi que la façon dont les réseaux neuronaux réagissent à ces anomalies et s'altèrent de manière permanente, avec l'hypothèse que ces altérations commencent in utero et/ou à la naissance. L'autisme (ou troubles du spectre autistique – TSA) est un trouble du développement caractérisé par des interactions sociales et une communication perturbée, ainsi que des comportements restreints et répétitifs.

Pendant la maturation cérébrale, le GABA, principal médiateur de l'inhibition cérébrale chez l'adulte, excite les neurones car ils présentent des taux élevés de chlorure intracellulaire. Toutefois, pendant l'accouchement il se produit une chute transitoire des taux de chlorure intracellulaire dans les neurones qui est régulée par l'hormone ocytocine (qui déclenche aussi le travail). Ces événements sont regroupés sous le terme de séquence maturative du GABA, séquence qui est altérée dans deux modèles animaux de TSA : le modèle Valproate in utero chez le rat, et le modèle génétique murin qui reproduit le syndrome de l'X-fragile. De plus, l'administration d'un médicament qui réduit les taux de chlorure dans les cellules corrige ces altérations ainsi que les séquelles comportementales et électrophysiologiques observées dans ces modèles.

Nos objectifs sont d'approfondir notre compréhension des modifications présentes dans les neurones « autistes » chez l'animal et de comprendre si les altérations de l'activité du neurotransmetteur GABA constituent une règle générale dans les TSA.

Pour notre projet, nous allons utiliser les modèles animaux du TSA suivants : (1) modèle du syndrome de Rett (souris génétiquement modifiées MeCP2-null avec un phénotype dommageable et des composantes de type autistique ; n=217), et (2) modèles autistiques Valproate in utero (VPA) ou en utilisant le blocage du récepteur à l'ocytocine (SSR) chez le rat (n=255). En total, 472 animaux.

Nous effectuerons les manipulations suivantes sur les animaux :

1. Genèse des modèles rongeurs d'autisme VPA et SSR. Pour l'injection de VPA, le produit sera dissout dans une solution saline et les rattes gestantes recevront une injection unique dans leur cavité péritonéale (i.p.) afin d'induire l'autisme chez les souriceaux. Le volume injecté sera calculé pour ne pas causer de douleur par distension de la paroi abdominale. Après injection, les souris seront surveillées pour détecter le moindre signe de détresse. Pour le SSR, les femelles gestantes boiront la drogue diluée dans l'eau de boisson le jour avant l'accouchement.

2. Euthanasie de certaines souris par perfusion intra-cardiaque de fixateur sous anesthésie profonde. L'anesthésique, un mélange de Kétamine et de Xylazine, sera administré par injection i.p. d'une dose calculée en fonction du poids de chaque animal.

3. Tests comportementaux : ces tests ont pour but d'évaluer si un traitement (donné aux femelles gestantes dans leur eau de boisson un jour avant l'accouchement) peut atténuer/abolir les comportements autistiques présents chez nos modèles rongeurs d'autisme. Il s'agira de placer les souris dans diverses situations non invasives et d'observer leur comportement. Ce type de procédure n'engendrera ni douleur ni contrainte chez les animaux.

Ce projet a été planifié pour appliquer au mieux les principes de réduction et de raffinement permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Concernant le remplacement, les études que nous proposons se focalisent sur l'organisation des réseaux neuronaux et la naissance, lesquelles ne peuvent être reproduites ni étudiées dans des modèles de cultures cellulaires *in vitro*. De plus, les souris transgéniques permettent de réaliser des expériences sur des modèles de maladies comme les troubles du spectre autistique. Pour prendre en compte le principe de réduction, nous avons déterminé de manière statistique le nombre d'animaux que nous allons utiliser par objectif et par tâche. Dans cette même optique, lorsque cela est possible, chaque animal servira à plusieurs mesures comportementales et/ou électrophysiologiques, histologiques et anatomiques, ainsi que d'imagerie. Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement via la mesure de leurs poids et l'observation de leur aspect physique et comportement. Si nécessaire, des mesures seront prises pour réduire leur stress et leur douleur. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux en cages équipées, en plus de l'enrichissement de base (maison en carton pour rongeurs qui permet aux animaux de dormir et se reposer, en plus de participer à leur exercice physique : grimper et explorer) et de matériaux de nidification.

11366 L'insuffisance cardiaque (IC) constitue une cause majeure de morbidité et de mortalité dans les pays occidentaux. La mortalité survient en raison de la dysfonction ventriculaire et des arythmies conséquentes à la suractivation du système nerveux sympathique et au remodelage cardiaque pathologique. La voie Beta-adrénergique (B-AR) conduit à l'augmentation de l'AMPc qui joue un rôle clé dans la régulation de la fonction cardiaque. Mais son activation chronique entraîne des perturbations électrophysiologiques (arythmies) et participe à la progression vers l'IC. Les niveaux d'AMPcyclique sont finement régulés par des enzymes qui le dégradent, les phosphodiesterases (PDEs). L'objectif général du projet est de tester l'hypothèse selon laquelle une thérapie génique par injection d'adénovirus associés (AAV-9) permettant l'augmentation de l'expression de phosphodiesterases de type 2, de type 3 ou de type 4 (PDE2A, PDE3A, PDE4B des enzymes dégradant l'AMP cyclique) dans le cœur pourrait protéger contre la progression vers l'IC et prévenir les arythmies cardiaques. Un corollaire de cette hypothèse est que l'augmentation de l'activité des PDEs pourrait être une alternative prometteuse ou un complément aux traitements actuels de l'IC. L'utilisation d'animaux est indispensable pour évaluer cette hypothèse. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont euthanasiés en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin aussi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Le recours à des animaux se justifie par la nécessité d'étudier la fonction cardiovasculaire dans un contexte physiologique et physiopathologique. Il se justifie par l'impossibilité d'obtenir des lignées de cellules cardiaques adultes, par le fait que les cellules cardiaques ne conservent pas un phénotype stable et ne survivent pas au-delà de 48h de mise en culture primaire. Il se justifie également par l'impossibilité de simuler *ex vivo* la mise en place de l'insuffisance cardiaque qui est un processus complexe. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). Une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude et pour avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. De l'enrichissement

sera ajouté dans les cages. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de souris utilisées sera de 390.

11367 En Europe, le traumatisme crânien (TC) est la cause la plus fréquente d'invalidité permanente chez les patients de moins de 40 ans. Aux lésions cérébrales primaires, engendrées par l'impact, se surajoutent, pendant les heures et les jours qui suivent, des lésions secondaires liées directement à la constitution des lésions primaires elles-mêmes, ainsi qu'à leurs conséquences physiopathologiques. Néanmoins certains travaux ont montré que les patients traumatisés crâniens étaient à risque de développer un syndrome post-commotionnel précocement après le TC. Ce dernier est l'association de troubles somatiques (céphalées, vertiges, tremblements, déficit sensitivomoteur) et psychiatriques (irritabilité, agitation, agressivité, troubles mnésiques, comportements à risque) pouvant avoir un retentissement socio-professionnel important.

De plus, le traumatisme de l'enfant comporte certaines spécificités dues à l'immaturation du cerveau et pourrait notamment être responsable de troubles du développement psychomoteur.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer le retentissement clinique d'un traumatisme crânien modéré de l'enfant. Pour cela nous utiliserons un modèle de traumatisme crânien modéré chez le souriceau mâle. Dans ce modèle, il sera étudié les déficits comportementaux au stade adulte. Le nombre de souris utilisées sera de 60 dans ce projet d'une durée de trois ans. La bonne reproductibilité et le faible taux de mortalité (3%) de ce modèle expérimental permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques.

Au stade adulte (P60), toutes les souris effectueront l'ensemble des tests comportementaux, afin de limiter le nombre d'animaux pour obtenir des mesures des performances.

Puis à la fin des tests comportementaux, les cerveaux seront prélevés afin d'effectuer les études immunohistochimiques pour étudier les lésions de la substance blanche.

Cette étude prendra en compte la réglementation des 3R :

Remplacement : L'étude de l'impact du traumatisme crânien sur les réseaux neuronaux à distance du TC ne peut être envisagée qu'*in vivo*. Au vu de notre expertise et des données de la littérature le modèle que nous utiliserons sera la souris non transgénique.

Réduction : Le nombre d'animaux estimé et les tests statistiques utilisés sont basés sur notre expérience pour ce type d'étude. Ce nombre minimum nous permettra d'être certains de répondre aux questions scientifiques de ce projet. L'analyse statistique de nos données nécessite n=15 animaux par groupe pour mettre en évidence une différence significative. Nous prévoyons de dupliquer cette étude, toutefois s'il s'avère que 15 animaux par groupe suffisent nous n'utiliserons que 30 animaux. C'est le nombre minimal de souris nécessaire pour l'obtention d'une puissance statistique suffisante avec les modèles expérimentaux de comportement. Néanmoins nous prévoyons de dupliquer l'étude, c'est la raison pour laquelle nous prévoyons 60 animaux. Les résultats seront analysés à l'aide d'une analyse de variance à un facteur ou deux facteurs pour mesures répétées, suivies d'un test de Fischer avec la correction de Bonferroni.

Raffinement : La procédure chirurgicale (durée inférieure à 2 minutes) sera réalisée sous anesthésie générale inhalatoire par Isoflurane. Une analgésie post-opératoire sera réalisée en la présence de signes de douleur (en fonction d'un score établi). Les animaux seront remis dans leur nid et on vérifiera que le retour au sein du nid se fait bien. Des grilles de scoring seront proposées en fonction de l'âge des animaux déterminants ainsi les points limites prédictifs : à la phase aiguë, on surveillera la fréquence respiratoire, la recoloration des extrémités, et le tonus ; à distance du TC on réalisera une surveillance régulière de la prise de poids, de l'absence de troubles du comportement (isolement, agressivité). Les animaux seront hébergés en groupe en milieu enrichi pour minimiser leur stress.

A la fin de l'étude les animaux seront euthanasiés selon les méthodes réglementaires.

11368 Les métastases cérébrales (MC) sont les tumeurs intracrâniennes du système nerveux central (SNC) les plus fréquentes chez les adultes, elles représentent la troisième maladie neurologique en termes d'incidence avec plus de 30.000 nouveaux patients par an en France. Ces métastases sont associées à un mauvais pronostic et à une morbi-mortalité importante ainsi qu'à une altération de la qualité de vie. La maladie métastatique implique plusieurs événements dont la dissémination des cellules tumorales à partir de la tumeur primitive.

Les données récentes suggèrent que ce sont essentiellement les cellules souches cancéreuses (CSC) qui sont capables de donner des métastases via un processus nommé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Ces CSC sont caractérisées par une capacité d'auto-renouvellement, une prolifération extensive, une capacité à se différencier et à reproduire une phénocopie de la tumeur d'origine. Les hypothèses actuelles postulent que les cellules souches métastatiques (CSMet) sont des CSC migrantes qui ont initié une tumeur à distance dans un nouveau site. A notre connaissance, il n'y a pas de donnée dans la littérature concernant l'identification de CSMet dans les MC (CSMetCer).

Ce projet a pour but, après isolation des CSMetCer issues de cancer colorectaux, de montrer leur capacité tumorigénique, à envahir et à nicher au sein d'un organe. Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans la dissémination tumorale, l'utilisation de modèles animaux apparaît essentielle. Les approches envisagées nécessitent la présence d'un système biologique fonctionnel qui est uniquement accessible dans des modèles d'animaux intègres et donc vivants. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier. Le protocole complet nécessite l'utilisation de 378 souris « nude » qui représente à ce jour l'espèce modèle de mammifères pour les études en cancérologie. A la fin de chaque protocole nous ferons une étude morphologique associée à une étude immunohistochimique et une caractérisation moléculaire. Les résultats seront ensuite comparés avec ceux obtenus à partir de la métastase cérébrale initiale.

La règle des 3R afin de remplacer, réduire et raffiner a été prise en considération. De nos jours, il n'est pas encore possible de modéliser un cerveau de mammifère *in vitro*, qui nous permettrait d'étudier la transplantation et donc de remplacer cette étude par des expériences *in vitro*. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique. Enfin, la notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation qui sont optimisées (sédation et analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales.

11369 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie rare (10 à 20 cas pour 100 000). Elle conduit à une insuffisance respiratoire et au décès dans les 3 ans qui suivent le diagnostic. Les traitements actuellement préconisés ne retardent que très modérément le déclin des fonctions respiratoires et restent très insuffisants. La fibrose pulmonaire est due à une cicatrisation exagérée des tissus pulmonaires. Elle est liée à une accumulation de facteurs pro-inflammatoires et profibrotiques qui conduisent à la transformation des cellules composants le poumon en cellules dites « mésoenchymateuses ». Les mécanismes moléculaires sont peu connus. Nos travaux préliminaires ont montré une accumulation de protéines de la famille des « IAP » dans le tissu pulmonaire d'animaux malades. Ces protéines sont des inhibiteurs de la mort cellulaire et des inhibiteurs appelés « Smac-mimetics » ont été synthétisés en vue d'une utilisation en thérapie anti-cancéreuse. Ces molécules montrent une bonne tolérance dans les essais cliniques. Or, les IAP sont aussi des régulateurs incontournables de la réponse inflammatoire. Ainsi, les « Smac-mimetics » pourraient trouver leur place dans le traitement de pathologie associée à un processus inflammatoire comme la fibrose pulmonaire.

L'objectif de cette étude est donc d'une part d'évaluer l'efficacité des molécules « Smac-mimetics » dans le traitement de la fibrose pulmonaire et d'autre part de mieux comprendre le rôle des IAP dans ce processus. Des expérimentations *in vitro* seront effectuées en parallèle afin d'évaluer le rôle des IAP dans la différenciation des cellules pulmonaires, mais ces expériences ne pourront en aucun cas se substituer à une étude sur l'animal dans la mesure où la fibrose pulmonaire est une pathologie touchant le poumon dans son ensemble, faisant intervenir différents types cellulaires.

Notre modèle expérimental de fibrose pulmonaire consiste en l'administration chez la souris d'un médicament la bléomycine. Ce modèle expérimental est un modèle de référence bien maîtrisé dans notre équipe de recherche. Les animaux bénéficieront d'une alimentation enrichie pour limiter la perte de poids pouvant être occasionnée par la bléomycine. L'administration des Smacs-mimetics se fera une à deux fois par semaine. Les concentrations choisies de Smac-mimetics n'ont pas montré d'effet toxique chez la souris. L'administration de la bléomycine et/ou « Smac mimetics » sera réalisée sous anesthésie générale des animaux. Des études préalables nous ont permis de définir les points critiques les plus précoces possibles afin d'éviter toute souffrance animale. D'après notre expérience, les animaux seront euthanasiés 21 jours après le début des injections. Ce délai est suffisant pour visualiser l'installation d'une fibrose sans attendre une dégradation de l'état général de l'animal.

Pour cette étude, 166 souris C57BL/6 seront utilisées. Ces souris seront réparties par groupes de 6 individus minimum, ce qui nous permettra d'obtenir des résultats robustes et statistiquement significatifs. Les animaux seront surveillés au jour le jour par mesure du poids et observation de leur comportement. Une perte de poids supérieure à 20% du poids initial entraînera l'euthanasie de l'animal.

11370 Les inflammations chroniques des tendons et des articulations sont fréquentes et difficiles à soigner. C'est un problème de santé publique avec un coût médico-économique important et des arrêts de travail prolongés. Des nouvelles artères (néovaisseaux) se forment et entretiennent cette inflammation. Une équipe de chercheurs japonais rapporte que le fait de boucher ces néovaisseaux par embolisation permet d'améliorer les patients souffrant de ces maladies chroniques. Cette approche doit être validée sur un modèle animal avant de pouvoir faire des tests chez l'homme notamment pour prouver qu'il n'existe pas de risque à priver de sang les tendons ou les articulations inflammatoires.

L'objectif de cette étude est donc la création d'un modèle animal qui associe une inflammation du tendon rotulien et le développement de néovaisseaux, puis de vérifier que l'embolisation de ces néovaisseaux est associée à une amélioration de la douleur et de l'inflammation. Il s'agit aussi de rechercher les complications liées à cette embolisation. La preuve de concept de cette nouvelle approche thérapeutique, peu morbide et maîtrisée par les radiologues interventionnels permettrait de déboucher sur les premiers essais cliniques chez les patients.

Le modèle choisi est celui du porc qui est un animal suffisamment gros pour permettre d'effectuer des interventions d'embolisation des artères. Un total de 20 animaux est prévu, 8 pour la phase de validation du modèle, 12 pour la phase de test. Dans un premier temps la procédure consistera à induire une inflammation locale au niveau du tendon rotulien par injection de collagénase de type 1. Les images réalisées par injection d'un produit de contraste au cours d'une artériographie permettront de valider la présence de néovaisseaux qui sont liés à l'inflammation. Dans un deuxième temps, les néovaisseaux seront bouchés en utilisant des billes de très petits calibres (microparticules définitives). Les animaux seront surveillés quotidiennement pour évaluer leur douleur. A la fin de la surveillance et après l'euthanasie des animaux, des prélèvements des tendons seront réalisés pour évaluer par étude microscopique (anatomopathologique) l'absence de complication.

Dans le cadre de ce projet, tout sera mis en oeuvre pour respecter au mieux la règle des 3R :

(Remplacer) Il s'agit d'une étude ayant pour objectif de vérifier l'efficacité et la précision d'une technique interventionnelle. Il n'existe pas de méthode alternative permettant d'atteindre cet objectif dans des conditions le plus proches possibles des cas cliniques.

(Réduire) Il s'agit d'une étude pilote. Le nombre d'animaux a été réduit en veillant toutefois de travailler sur un nombre suffisant pour obtenir une différence significative entre les différents groupes.

(Raffiner) Le projet visant à provoquer une inflammation au niveau du genou, l'apparition d'un inconfort ou d'une douleur modérée est prédictible. Le bien-être de l'animal sera amélioré en veillant aux conditions d'hébergement et un certain nombre de critères feront l'objet d'une surveillance

accrue pour permettre l'évaluation de l'état général de l'animal et la prise de décisions adéquates. Les gestes interventionnels seront toujours réalisés sous anesthésie générale afin de prévenir la souffrance et l'anxiété de l'animal, de même que l'euthanasie. De plus le personnel impliqué dans le projet est formé à l'expérimentation animale et la chirurgie expérimentale chez le porc.

11371 Chez les mammifères, le comportement dipsique ou comportement de prise de boisson, est un comportement motivé nécessaire à la survie de l'individu. L'organisme possède un système d'alarme qui régule le comportement dipsique en fonction des besoins de notre organisme. Le maintien de l'équilibre hydrominéral dans les différents compartiments cellulaires est primordial à la survie des cellules. La régulation de cet équilibre sodique et hydrominéral implique une participation active et coordonnée de divers sites périphériques et centraux.

Le système endocannabinoïde (SEC) du cerveau régule de multiples fonctions, dont l'appétit, l'activité musculaire, l'anxiété, la douleur ou encore la mémoire. La grande majorité des altérations mentales causées par le cannabis sont provoquées par la capacité du principe actif du cannabis, le delta 9-tétrahydrocannabinol (THC) à activer des récepteurs du SEC. Il a été montré que ces récepteurs sont exprimés au niveau des régions cérébrales régulant la consommation d'eau. Cependant, aucune étude à ce jour ne s'est intéressée au rôle de ces récepteurs dans le comportement dipsique. Ainsi, le projet a pour but de comprendre comment ces récepteurs du SEC sont impliqués dans la consommation d'eau.

La durée prévue pour ce sujet est de 5 ans. Il sera réalisé chez la souris du fait de la complexité des mécanismes et des circuits neuronaux qui seront étudiés et qui sont conservés chez les mammifères, y compris chez l'homme, mais absents ou très différents chez les invertébrés. Un nombre total de 1732 animaux est nécessaire pour concevoir ce projet.

D'un point de vue méthodologique, nous nous engageons à respecter le principe des 3R (remplacement, réduction, raffinement) : 1) Remplacement : Dans ce projet, les méthodes alternatives (cultures cellulaires *in vitro*, modélisation *in silico*) fournissent des informations trop limitées et ne peuvent reproduire toute la complexité d'un organisme vivant. 2) Réduction : Les animaux utilisés dans chacun des groupes expérimentaux n'excéderont pas 12 animaux c'est-à-dire le nombre minimal d'échantillons permettant l'application de tests statistiques classique dans le domaine. Ce nombre d'animaux par groupe tient en compte du taux d'échec de 15 % lors des procédures de neurochirurgie. 3) Raffinement : tous les protocoles sont optimisés pour soulager le stress et la douleur des animaux tout au long de l'étude. Ainsi, les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale avec une couverture analgésique (lidocaine en local et buprénorphine en sous-cutanée) ce qui permettra une limitation de la douleur pendant et après le réveil de l'animal. Les animaux sont observés quotidiennement par un personnel qualifié afin d'assurer la propreté et le bien-être des animaux. Une surveillance renforcée des animaux, la mise en place d'une réhydratation, un réchauffement et des traitements vétérinaires seront réalisés si besoin après la chirurgie des animaux. Des points limites sont définis et décrits dans les procédures pour éviter la souffrance des animaux. Le milieu d'élevage des souris est enrichi (matériel de nidation).

11372 Le système immunitaire est activé en cas d'infection par les bactéries et les virus mais également au cours du développement de cancer. Plusieurs études se sont déjà attachées à identifier le rôle des différents globules blancs au cours d'un cancer et d'autres études ont montré que la chimiothérapie pouvait moduler les proportions des différentes populations de globules blancs. Des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe montrent que le Cisplatine (une chimiothérapie utilisée dans le traitement des cancers du poumon) recrute des populations particulières de globules blancs, appelés ILCs pour innate lymphoid cells ou cellules lymphoïdes innées. Les données de la littérature indiquent que les ILCs pourraient être à l'origine de structures appelées TLS (Structures Lymphoïdes Tertiaires) qui pourraient permettre la mise en place d'une réponse immunitaire anti cancéreuse efficace. C'est pourquoi nous souhaiterions étudier (1) ce qu'il se passe dans les tumeurs après que les souris aient reçu un traitement par Cisplatine, et (2) l'impact que cela a sur la réponse anti tumorale.

Les ILC partageant l'expression de nombreuses molécules avec les lymphocytes Th17, il est primordial de pouvoir discriminer de ces deux types cellulaires. C'est pourquoi, nous étudierons la proportion de chaque population de globules blancs au cours du temps dans les tumeurs de souris non traitées, traitées par Cisplatine dans des souris C57Bl6 WT ou RORc ff x CD4 Cre (souris dépourvue de Th17). Nous utiliserons 1 modèle de tumeurs : TC-1 (lignée de cancer du poumon) qui possède un fort infiltrat en globules blancs. Ainsi, les souris C57Bl6 ou RORc ff x CD4 Cre recevront une injection de 2×10^5 cellules tumorales dans la patte. Dix jours après l'injection, lorsque la tumeur est mesurable, les souris seront traitées avec du PBS ou 6 mg/kg de Cisplatine. Les souris seront euthanasiées après 7 jours de traitements ou à la fin de la croissance tumorale, lorsque les tumeurs auront atteint une taille de 2000mm³. Les tumeurs seront isolées, dissociées et les populations de globules blancs seront étudiées par cytométrie de flux.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront répétées que trois fois et les tumeurs seront analysées sur les mêmes animaux ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. De plus, nous avons fait appel à une méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants. Des études préliminaires ont été réalisées sur les cultures de cellules *in vitro* limitant ainsi l'utilisation d'animaux cependant les expérimentations *in vitro* ne suffisent pas à appréhender la complexité d'un organisme. (Remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections sous-cutanées des tumeurs et euthanasie) seront réalisées sous anesthésie permettant ainsi le raffinement de l'étude. Des points limites spécifiques sont définis dû à la présence de tumeurs et dont l'atteinte entraînera l'euthanasie des animaux pour éviter toute souffrance. Les souris seront maintenues dans des cages ayant un milieu enrichi. Cette étude nécessitera 60 souris C57Bl6, et 60 souris RORc ff x CD4 Cre.

11373 Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice visqueuse. La formation d'un biofilm se fait selon un modèle bien établi et suit différentes étapes (adhésion, croissance, maturation et dispersion). Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. Les bactéries du biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les cellules bactériennes planctoniques (non adhérentes). Ainsi, la présence de biofilm dans les infections est particulièrement redoutée en clinique (ex : sondes de ventilation mécanique, prothèses, cathéters veineux...). Parmi les espèces bactériennes largement retrouvées dans les biofilms figurent les espèces du genre *Staphylococcus* sp.

Le but de notre projet est de tester l'efficacité de la molécule BFP074F10 seule ou en association avec la gentamicine sur la capacité à inhiber l'installation d'un biofilm à *Staphylococcus aureus* dans un modèle *in vivo* d'infection sur cathéter chez la souris BalbC. Une souche sera testée et au total 105 animaux utilisés.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R.

L'hébergement des animaux sera pratiqué dans un milieu enrichi (jouet en plastique, igloo en carton). Le nombre d'animaux a été réduit à 7 souris par groupe au lieu de 10 compte tenu des expériences précédentes menées au laboratoire et la procédure chirurgicale a fait l'objet de différentes mises au point, permettant d'optimiser le temps et la récupération des animaux. Un gros travail a été réalisé *in vitro* sur l'efficacité de cette molécule anti-biofilm ainsi qu'une pharmacocinétique chez la souris. Toutefois l'efficacité de tels composés ne peut être que confirmée dans des modèles précliniques, c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée. De plus, la technique d'infection sera réalisée sous une anesthésie fixe et une visite à 6 et 12h post infection sera réalisée par nos soins afin d'assurer au maximum le bien-être des animaux.

11374 Les phénomènes de neuro-inflammation représentent l'ensemble de la réponse immunitaire résidant dans le système nerveux central ou en provenance de la périphérie. Dans le cerveau, les

cellules résidentes impliquées sont composées des astrocytes et des cellules microgliales. Ces cellules s'activent en réponse à la présence d'infections, de lésions cérébrales ou de molécules toxiques. Une neuro-inflammation est également démontrée dans de nombreuses pathologies cérébrales (maladies neuro-dégénératives comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, dans la dépression, la schizophrénie ou encore la sclérose en plaques amyotrophique). Ainsi, il est primordial de pouvoir détecter et quantifier les niveaux d'inflammation cérébrale à des fins diagnostiques et d'efficacité thérapeutique. Une protéine appelée TSPO a été montrée comme étant fortement liée aux phénomènes neuro-inflammatoires mais son rôle dans ces phénomènes reste flou.

Le but de cette étude est d'étudier le rôle de la protéine TSPO chez des souris n'exprimant pas cette protéine (souris déficientes). Une molécule permettant l'expression du TSPO sera injectée dans un des côtés du cerveau chez des souris déficientes et chez des souris contrôles. Quatre traceurs couplés au 18-Fluor seront utilisés pour comprendre le rôle de TSPO dans les mécanismes de neuro-inflammation. Ces études seront réalisées en imagerie TEP/TDMX lors d'une étude longitudinale.

Un total de 170 souris seront utilisées dans cette étude.

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

-Réduire : Nous n'utiliserons que 20 animaux par groupe, 20 étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ce modèle qui présente une grande variabilité interindividuelle. 10 animaux supplémentaires sont prévus en cas de sortie d'étude prématurée. Nous utiliserons à la fois des souris mâles et femelles permettant ainsi d'optimiser les animaux issus de de l'élevage. De plus, l'imagerie nous permet de suivre un même animal plusieurs fois, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure.

-Raffiner : Enrichir l'environnement des animaux avec des tubes en plastique, former des groupes sociaux (5 animaux par cages). Des cotons d'ouate sont déposés dans la cage afin de pouvoir fabriquer des nids. La nourriture et l'eau sont donnés ad libitum. Le cycle jour/nuit est 12/12h. La manipulation des animaux se fait sous anesthésie gazeuse et sous analgésie. Les animaux sont suivis par du personnel qualifié.

-Remplacement : nous sommes obligés d'utiliser des animaux car l'objectif du travail est de visualiser la protéine TSPO au niveau cérébral ce qui ne peut être fait qu'*in vivo*.

11375 Notre institut a pour mission de créer des lignées de rats et de souris génétiquement modifiées. Ces lignées peuvent devenir des modèles de maladies humaines et vont permettre de mieux comprendre leurs processus de développement. Ces modèles peuvent également répondre à d'autres intérêts scientifiques tout aussi important (comme par exemple devenir des modèles de choix pour la recherche fondamentale). Ces rongeurs, en tant que modèle de maladies humaines, vont également permettre de tester des médicaments et de valider (ou d'invalider) des cibles thérapeutiques.

A l'heure actuelle des connaissances, nous ne pouvons pas nous passer du recours aux animaux pour les études. Toutes ces techniques nécessitent l'utilisation d'animaux. La réduction du nombre d'animaux utilisés et leur bien-être est une préoccupation permanente. L'amélioration des techniques permet sans cesse de répondre aux exigences de réduction et de raffinement.

Les embryons, pour être génétiquement modifiés, sont produits par super-ovulation des femelles (pour augmenter le nombre d'ovocytes produits naturellement). Cette technique permet de réduire le nombre de femelles nécessaire pour la création d'une lignée transgénique.

Ces embryons sont ensuite micro-manipulés pour produire des animaux génétiquement modifiés.

Il y a 2 techniques utilisées :

- soit par micro-injection d'ADN (appelé transgène) dans le noyau d'un embryon âgé d'un jour (injection pronucléaire d'ADN)

- soit par l'injection de cellules souches embryonnaires génétiquement modifiées dans la cavité d'un embryon souris âgé de 3,5 jours ou un embryon de rat âgé de 4,5 jours appelé blastocyste.

Ces embryons manipulés sont ensuite réimplantés dans une mère-porteuse, en pratiquant une intervention chirurgicale sous anesthésie et analgésie. La chirurgie se déroule sur un tapis chauffant pour éviter l'hypothermie et du gel oculaire est placé sur les yeux pour prévenir le dessèchement. Ensuite, les souris restent en observation jusqu'à leur complet réveil en bonne forme, dans leur cage placée sur une platine chauffante à 30°C. Des enrichissements sont également mis à disposition dans les cages d'hébergement.

Les animaux, nés des mères-porteuses, sont ensuite analysés pour identifier les individus transgéniques.

Chaque lignée transgénique est ensuite archivée, soit sous forme d'embryons congelés, soit sous forme de sperme congelé (uniquement pour les souris). Le maintien des embryons sous forme congelée ainsi que la congélation du sperme permettent de sauvegarder les lignées transgéniques dans le temps sans les garder sous forme respirante (animaux vivants) (réduire et remplacer) et favorise les échanges entre laboratoire géographiquement éloignés et/ou de statut sanitaire incompatible. La congélation (et donc l'archivage) fait également appel à des femelles superovulées (réduire).

Pour les souris, nous comptons 204 souris/projet. Il y a 250 projets par an envisagés sur 5 ans donc 255 000 souris au total.

Pour les rats, nous comptons 304 rats/projet. Il y a une centaine de projets envisagés sur 5 ans donc 152 000 rats au total.

Ainsi, un maximum de 407 000 animaux seront utilisés pour cette saisine.

11376 L'adénocarcinome du pancréas (ADKP) est le type de cancer pancréatique le plus répandu (85% des néoplasmes pancréatiques). Il représente la 4ème cause de mortalité par cancer, avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 5%. Ce cancer est prédit pour devenir la 2ème cause de mortalité par cancer dans les pays industrialisés à partir de 2030, si aucun progrès significatif n'est apporté dans les prochaines années. Le mauvais pronostic de ces patients provient du diagnostic tardif et d'une résistance acquise aux chimiothérapies conventionnelles. La prédominance en protéines de la Matrice Extra Cellulaire (MEC) constitue une caractéristique de ce cancer et participe notamment à sa résistance aux traitements actuels. Parmi les glycoprotéines matricielles, la famille des Ténascines (TNs) compte 4 membres (C, R, W et X) qui partagent une structure modulaire commune. Dans le microenvironnement tumoral, il a été démontré que les TNC et TNW pouvaient stimuler la progression des cellules tumorales. A l'inverse de ces deux protéines, le rôle de la TNX dans la progression tumorale reste peu exploré.

Des études de banques de données géniques ont permis de montrer que dans les adénocarcinomes pancréatiques et mammaires, les ARNm codant la protéine TNX étaient sous-exprimés dans les tissus tumoraux comparativement aux tissus adjacents histologiquement sains. Au contraire, les ARNm codant la TNC étaient surexprimés. Par ailleurs, des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence le rôle inhibiteur de la TNX sur l'étalement, la migration et l'invasion de cellules tumorales dans des gels de collagène mimant un microenvironnement en 3 dimensions. Ces études préliminaires réalisées *in silico* et *in vitro* permettent d'envisager un rôle potentiellement oncosuppresseur de la TNX.

Le but de l'étude est donc d'analyser précisément le rôle de la TNX dans la carcinogenèse pancréatique *in vivo*. Le modèle mammifère le plus adapté pour réaliser cette étude reste la souris puisqu'au travers des différents modèles transgéniques disponibles, il permet d'étudier précisément le développement tumoral dans un organisme complexe s'apparentant à l'homme. Pour se faire, nous utiliserons un modèle de prédisposition au cancer pancréatique permettant d'induire spécifiquement l'expression d'une protéine KRAS mutée sur le codon 12 dans les cellules pancréatiques. Cette mutation de KRAS est retrouvée dans 75 à 95 % des cancers du pancréas, mais aussi dans les lésions précancéreuses. Ces souris exprimant la protéine KRAS mutée dans le pancréas seront croisées avec des souris invalidées ou non pour le gène de la TNX. Ainsi, nous pourrons suivre le rôle de la TNX au cours du développement tumoral et les métastases potentiellement induites dans le foie, le poumon, le péritoine et l'intestin.

Ce projet implique d'une part l'élevage de souris Tnx-/- . Ces souris sont à phénotype dommageable puisqu'elles présentent une hyperlaxité de la peau et une faiblesse musculaire comme ce qui a été décrit chez certains patients Ehlers-Danlos présentant une déficience au niveau du gène TNXB. Cependant, l'espérance de vie de ces souris dépasse 1 an et nous savons d'ores et déjà que ces souris sont fertiles. Pour cette procédure d'élevage, nous prévoyons d'utiliser 20 souris par an pendant 5 ans.

Deux procédures sont prévues par la suite dans ce projet :

(1) La première consistera à analyser les souris de chaque génotype (KRAS+ invalidées ou non pour la TNX) à des âges représentatifs de l'évolution de l'adénocarcinome pancréatique dans ce modèle de prédisposition (50, 100, 150 et 200 jours). Après l'euthanasie aux temps indiqués, différents organes seront prélevés (pancréas, foie, péritoine et duodénum) et fragmentés de manière à analyser les échantillons par histologie, immunohistochimie, qRT-PCR et Western Blot. 10 souris par lot seront analysées, ce qui correspond à un nombre suffisant de souris pour réaliser une étude statistique robuste sur l'ensemble des expériences réalisées. 80 souris seront donc utilisées au total pour cette procédure.

(2) La seconde étude visera à suivre en temps réel (1 fois par mois, sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane) le développement de la pathologie par échographie à haute résolution couplée à une analyse photoacoustique (VEVO®LAZR, VisualSonics). Les animaux (10 animaux/génotype) seront euthanasiés en point limite ou à 80 semaines de développement si aucun point limite n'est atteint et les différents organes précités seront analysés comme pour la procédure précédente. A nouveau, ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour réaliser une étude statistique robuste. 20 souris seront donc utilisées au total pour cette procédure.

L'ensemble de ce projet implique donc 200 souris.

Une attention particulière sera apportée au bien-être de l'animal : les patients atteints d'adénocarcinome pancréatique présentent une perte de poids moyenne de 8,1% dans les 3 mois précédant le diagnostic. Les souris seront pesées 1 fois par semaine. La pesée nous permettra d'établir une courbe de croissance pour chaque animal et de déterminer le poids maximal. Les animaux seront euthanasiés si la perte de poids excède 20% du poids maximal de l'animal. Les patients atteints d'un cancer du pancréas développent couramment une jaunisse. Ce symptôme est retrouvé chez la souris dans le modèle utilisé de prédisposition au cancer du pancréas. Nous surveillerons donc le développement éventuel d'un ictère au niveau du dos des pattes des souris et des oreilles et la couleur de selles. Par ailleurs, d'autres signes évocateurs de mal-être seront également suivis de manière tri-hebdomadaire (poils hirsutes, prostration, détresse respiratoire, formation de papillome entravant le bien-être de l'animal) et conduiront à une euthanasie de celui-ci si ils étaient observés.

11377 Une partie des virus qui infectent les voies respiratoires sont capables d'atteindre le système nerveux central. Pour ce faire les virus doivent traverser la barrière hémato encéphalique qui protège le cerveau. Cette barrière est beaucoup plus perméable au niveau de la muqueuse olfactive. Située dans la cavité nasale, cette muqueuse est constituée de neurones capables de détecter les odeurs de l'environnement. Ces neurones sont en contact étroit avec les odeurs et envoient des informations directement dans le cerveau en traversant la barrière hémato-encéphalique. Des virus peuvent infecter ces neurones et atteindre des structures nerveuses centrales en suivant la même voie que les informations nerveuses. Les encéphalites engendrées ont une issue souvent dramatique pour les hôtes.

Il existe une grande variabilité dans la capacité des virus respiratoires à atteindre le système nerveux central. Or à l'heure actuelle, les mécanismes d'infection et de défense de la muqueuse olfactive sont très peu décrits. Le but du présent projet est de mieux comprendre les processus d'infection et les défenses immunitaires mises en place pour limiter l'entrée de ces virus vers le système nerveux central. Deux virus respiratoires seront étudiés dans ce cadre de ce projet, le virus influenza dont certaines souches sont connues pour infecter le système nerveux central et le virus respiratoire syncytial (VRS) dont l'infection se limite aux voies respiratoires.

Le projet utilise la souris comme modèle animal car l'infection de ce rongeur par ces virus reproduit très bien les mécanismes inflammatoires observés chez les autres mammifères. L'emploi de souris permet donc d'étudier en détail la réponse immunitaire développée en réponse à l'infection et de transposer ces résultats aux autres mammifères.

Les souches de souris de référence étudiées sont les lignées Balb/c pour le virus influenza et C57Bl/6 pour le VRS. Nous utiliserons également des lignées génétiquement modifiées pour des gènes de l'immunité afin de décrypter les mécanismes moléculaires mis en place. Pour chaque mécanisme étudié, il faut comparer des animaux contrôles à des animaux traités ou modifiés génétiquement. Afin que l'effet puisse être validé statistiquement, un groupe doit comporter 10 animaux. L'estimation annuelle de l'emploi de souris pour ce protocole est de 280 souris, ce qui représente un total de 1400 souris pour l'ensemble du projet qui dure 5 ans. Après euthanasie, l'impact du virus sera étudié sur de nombreux organes : poumons, cavité nasale et différentes parties du cerveau.

Ces animaux sont élevés spécialement pour notre étude de l'immunité antivirale, ils proviennent d'élevages reconnus et sont nés en captivité. L'utilisation d'animaux pour ces expériences est nécessaire car il n'est pas possible d'étudier les interactions entre système immunitaire, muqueuse olfactive et système nerveux central sur des lignées cellulaires. Nous utiliserons également en parallèle un système d'étude *in vitro* sur cellules en culture. Cette approche permet de limiter l'emploi d'animaux dans certaines étapes spécifiques d'étude d'un facteur sur les cellules de la muqueuse olfactive.

Une attention particulière sera apportée à l'emploi d'un nombre minimal d'animaux tout en maintenant des effectifs compatibles avec l'analyse bio-statistique.

Les animaux sont élevés en groupe sociaux dans des cages (6 animaux maximum dans une cage) et du papier absorbant ainsi que des tubes en carton sont ajoutés pour enrichir le milieu. L'état de santé des animaux sera l'objet d'une attention particulière, les souris seront surveillées tout au long de l'expérience et l'état général sera évalué grâce à des critères stricts basés sur la perte de poids, la température corporelle ainsi qu'à l'établissement d'un score clinique approprié à la gravité de l'infection.

11378 Une approche thérapeutique unique : l'immunisation active anti-cytokine par administration d'un vaccin Kinoïde anti interféron.

Les cytokines sont des protéines naturelles qui assurent la communication intercellulaire et orchestrent les réponses immunitaires et inflammatoires. La surexpression des cytokines a été identifiée comme l'une des causes de l'apparition ou du développement de pathologies auto-immunes, inflammatoires ou cancéreuses.

Une nouvelle stratégie d'immunothérapie active reposant sur la production, par le système immunitaire du patient, d'anticorps anti-cytokine après administration d'un candidat vaccin (cytokine cible couplée à une protéine porteuse) a été développée : Le Kinoïde.

Le Kinoïde sera administré sous forme d'émulsion avec un adjuvant de type huileux (ISA51vg) ou à un adjuvant à base de squalène, induisant une réponse naturelle d'anticorps polyclonaux spécifiques de la cytokine-cible, capable de neutraliser son activité pathologique.

Ce projet s'inscrit dans le cadre du développement de vaccins thérapeutiques anti-cytokine et ciblant la cytokine interféron-alpha (IFN α).

Le candidat vaccin, appelé IFN-Kinoïde (ou IFN-K) fait l'objet d'un essai clinique de phase IIb chez les patients souffrant de lupus.

Lors de la production de lot du candidat vaccin, un test d'activité est réalisé chez la souris pour attester de son efficacité. Ce test cherche à montrer la capacité du vaccin à induire chez la souris une réponse immunitaire en fonction d'une dose injectée précise. L'utilisation dans ce test d'une lignée de souris transgénique, c'est-à-dire des souris qui produisent en plus de l'interféron murin (mIFN), de l'interféron humain (hIFN), permettra au système immunitaire de la souris de ne plus considérer l'interféron-alpha contenu dans le Kinoïde (IFN-K) comme un antigène étranger

(hétérologue) mais comme un antigène du soi (homologue), ce qui n'activera pas la même voie de réponse immunitaire. Ces conditions miment les réponses immunes de l'homme et sont donc plus pertinentes que les tests utilisés jusqu'ici avec des lignées de souris classiques (i.e. non transgéniques). Dans ce dernier cas le vaccin humain est reconnu comme étranger par la souris ce qui biaise le contexte de la réponse immunitaire. Une des premières étapes de cette étude vise à définir les meilleures conditions du test à savoir, nombre des souris, sexe, dose à injecter et schéma d'immunisation.

Expérimentation animale

L'évaluation de la stimulation d'un système immunitaire ne pouvant s'effectuer que sur animaux vivants le candidat Kinoïde sera testé sur 10 souris transgéniques hétérozygotes, 5 femelles et 5 mâles, afin de valider l'apparition des anticorps anti-interféron alpha humain (hIFN) générés au cours du protocole d'immunisation. 2800 animaux en tout pourront être utilisés sur 5 ans (environ 560 animaux/ans). Les contraintes imposées à l'animal sont modérées. Les injections intramusculaires et les prélèvements au sinus retro-orbital (sous anesthésie) n'induisent pas de modification durable de leur bien-être. Seul le stress de la contention impacte brièvement leur comportement. Les points limites seront évalués de manière à éviter toute détresse ou souffrance des animaux inclus dans le protocole.

11379 La grippe est une maladie aiguë des voies respiratoires, due à une infection par le virus influenza. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les virus influenza sont responsables, chaque année, de 3 à 5 millions de cas graves d'infections dans le monde, entraînant 200 000 à 500 000 décès. La grippe constitue donc un problème majeur de santé publique.

Outre la vaccination (préventive), il est possible de traiter les patients infectés par des molécules antivirales spécifiques (curatives). Ces dernières, dirigées contre des protéines virales, visent à diminuer le pouvoir répliquatif du virus. Malheureusement, de nombreux virus sont devenus résistants aux antiviraux actuels. Il est donc urgent de trouver de nouvelles stratégies contre la grippe, n'entraînant pas de résistance virale. Pour cela, une stratégie prometteuse est de cibler la réponse de l'hôte plutôt que le virus.

C'est dans cet objectif que notre étude s'est portée sur le rôle du récepteur activé par les proliférateurs des peroxyosomes (PPAR) dans la pathogénicité des virus de la grippe. Nos premiers résultats *in vitro* semblent indiquer que PPAR inhibe la réplication du virus influenza. Ainsi, l'objectif est d'activer PPAR *in vivo* afin de proposer une nouvelle stratégie de lutte contre les infections grippales.

Dans le but de développer une nouvelle cible thérapeutique contre la grippe, aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux. La souris est le modèle animal qui sera utilisé dans cette étude, en tenant compte de l'expérience des membres du projet utilisant cette espèce pour les infections virales ainsi que les données de la littérature scientifique.

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

Afin de limiter la douleur, les souris seront surveillées et pesées chaque jour, y compris les weekends et les jours fériés. Par ailleurs, afin de limiter et de prévenir toute souffrance et angoisse des animaux, nous mettrons en œuvre des mesures d'acclimatation des souris en zone d'hébergement pendant 7 jours après leur arrivée. Les cages seront également enrichies, notamment avec du coton.

La mise en place d'une grille d'évaluation de l'état de santé de l'animal (appréciation de l'apparence, du comportement et de signes cliniques définis), permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. Les scores clairement établis permettent d'envisager l'utilisation d'antalgiques si nécessaire. Une anesthésie (Kétamine/Xylazine par voie ip) est pratiquée lors de l'infection virale par voie intranasale afin de minimiser le stress. Les points limites sont fixés à 20% de perte de poids de l'animal ou un score d'évaluation supérieur ou égal à 15/19.

Nombre total d'animaux inclus dans ce projet : 504.

11380 Le projet a pour but d'établir un modèle tumoral leucémique de cellules cancéreuses humaines sur un modèle de souris sans système immunitaire.

Ce projet vise à établir des greffes de cellules leucémiques issues directement de patients chez la souris. Ces greffes dites de « tissu frais » sont importantes car elles reflètent plus fidèlement la maladie rencontrée chez l'homme que les modèles faisant appel à des lignées cellulaires, dont la culture prolongée *in vitro* a pu modifier les caractéristiques. En raison de la difficulté de prise des tumeurs chez la souris, nous faisons appel au modèle de souris Nog. Ce modèle est choisi car il est profondément immunodéficient c'est à dire avec un système immunitaire très démuné : avec un manque de tous les types de lymphocytes (cellules clés de l'immunité). Dans le cadre de ce projet nous visons à établir et stabiliser des modèles de leucémies afin de pouvoir par la suite caractériser leur réponse aux traitements conventionnels ainsi qu'aux nouveaux traitements expérimentaux.

Cette étude permettra d'avoir un modèle de leucémie humaine chez la souris afin de débiter la recherche de molécule efficace.

Cette étude sera réalisée sur souris immunodéprimée modèle Nog avec un effectif total prévu de 300 souris.

Les souris recevront une injection de cellules leucémiques en intraveineux au niveau de la veine de la queue. Ces dernières seront suivies par prélèvement sanguin pour voir le développement de la maladie. Le prélèvement de sang se fera au niveau du sinus rétro-orbital (oeil) après avoir utilisé un anesthésiant local : la tétracaine.

Ce projet prendra en compte la règle des 3 R. En effet cette étude cherche à développer un modèle permettant d'étudier les interactions entre la cellule leucémique et son environnement normal et doit donc être réalisée sur un organisme entier. La mise au point du modèle sera faite sur le nombre minimal de souris nécessaire et la confirmation des résultats sera réalisée sur un nombre minimal d'animaux permettant de conclure de façon fiable. Enfin, afin de respecter le bien être animale, les souris sont dans des cages avec un milieu enrichi avec du coton pour qu'elles se fassent un nid, de la fibre pour jouer, des rouleaux pour se cacher, jouer etc.

Notons que dans ce projet toutes les précautions nécessaires seront prises pour détecter et minimiser la souffrance des animaux (respect des points limites définis).

11381 Les arythmies cardiaques sont une cause importante de morbidité et de mortalité dans les pays développés et constituent un problème de santé publique. Certaines arythmies observées peuvent être dues à une mutation génétique rare d'un canal intracellulaire qui joue un rôle essentiel dans la contraction des cellules cardiaques et du cœur dans son ensemble. Les patients ayant ces mutations présentent des troubles du rythme cardiaque, pouvant entraîner une syncope voire une mort subite de ces patients. Or, les anciens médicaments anti-arythmiques se sont montrés inefficaces voire dangereux, et seuls les bêta-bloquants et défibrillateurs implantables semblent capables de prévenir le décès des patients. Dans ce contexte, il est donc nécessaire d'axer la recherche vers le développement de nouveaux agents thérapeutiques contre les arythmies.

Les précédentes études ont montré que l'expression d'une protéine régulant le canal essentiel pour la contraction du cœur est diminuée lors d'insuffisance cardiaque, nous laissant supposer que cette dernière joue un rôle essentiel dans le développement des arythmies. De plus, lorsque cette protéine est surexprimée dans les cellules cardiaques, les arythmies cardiaques sont prévenues. Mais à ce jour, les mécanismes contre le développement des troubles du rythme lié à la surexpression de cette protéine restent largement incompris. Afin de progresser dans la compréhension de ces mécanismes préventifs et dans le but de développer de nouvelles thérapies contre certaines formes d'arythmies cardiaques, nous avons créé 2 lignées de souris surexprimant cette protéine d'intérêt, avec des niveaux d'expression différents.

La première partie de ce projet consiste à caractériser la fonction cardiaque de ces 2 lignées de souris par échocardiographies, par électrocardiogrammes en Holter (ECG) et par IRM, sur 116

souris. Les sessions d'imagerie réalisées sous anesthésie et avec monitoring constant n'occasionnent aucune douleur, ni angoisse chez les animaux.

La seconde partie du projet consiste à tester l'effet protecteur de la surexpression de notre protéine d'intérêt dans le cadre d'une mutation génétique rare induisant des arythmies (CPVT). Pour cela, une lignée de souris possédant une mutation familiale CPVT sera mise en reproduction avec la lignée de souris surexprimant faiblement notre protéine d'intérêt. La fonction cardiaque de ces animaux sera étudiée par échocardiographies et ECG en limitant le nombre de souris à 96.

Ce projet dans son ensemble a pour but de mieux comprendre le mécanisme anti-arythmique de notre protéine d'intérêt et la physiopathologie moléculaire des arythmies lors d'une mutation familiale et permettre ainsi de développer une nouvelle thérapie contre cette maladie. Les modèles animaux ne peuvent être remplacés par un modèle *in vitro* ne présentant pas l'environnement cellulaire complexe et adéquate, ni sur des lignées de cellules cardiaques adultes, ces cellules ne conservant pas un phénotype stable et ne survivant pas au-delà de 48h de mise en culture primaire. Néanmoins, nous réduisons au maximum le nombre d'animaux utilisés à 212 dans la limite statistique raisonnable d'une étude scientifique. Les procédures utilisées se font dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectant au maximum le bien-être des animaux, tout en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques.

11382 Les anticorps immunomodulateurs permettent d'obtenir des fontes tumorales durables dans le temps dans des cancers métastatiques en rechute habituellement non sensibles aux thérapies conventionnelles et dans des types histologiques aussi divers que le mélanome, le cancer du poumon ou le cancer de vessie. L'arrivée de ces anticorps en oncologie pédiatrique est en cours. Le challenge thérapeutique des années à venir est d'identifier des combinaisons thérapeutiques permettant et d'augmenter le nombre de sujets sensibles à ces traitements et en augmenter l'efficacité.

Des travaux précédents ont montré que les vaccins anti-infectieux disponibles commercialement contre les rotavirus avaient des vertus oncolytiques, c'est à dire capables de tuer spécifiquement les cellules tumorales dans différents modèles tumoraux. Il s'agit de produire la preuve de concept que ces vaccins anti-infectieux, produits de grade clinique, commercialement disponibles et peu onéreux, peuvent augmenter l'efficacité des anticorps immunomodulateurs quand utilisés en combinaison.

1-Objectif scientifique du projet : Valider le pouvoir oncolytique de ces vaccins commercialisés dans deux modèles tumoraux afin de valider les combinaisons synergiques permettant d'améliorer l'efficacité thérapeutique des anticorps immunomodulateurs en oncologie. Etudier l'impact d'une pré-immunisation vaccinale sur l'efficacité anti-tumorale de ces vaccins par analyse de la régression tumorale.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie : Production du rationnel pré-clinique nécessaire à la réalisation d'un essai clinique de phase I/II testant la faisabilité et la toxicité de la stratégie d'immunisation *in situ* avec d'injections intra-tumorales d'agents immunostimulants tels que les vaccins anti-infectieux.

3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Les expériences de ce projet ont été optimisées pour une utilisation minimale des modèles animaux. Les vaccins anti-infectieux ont été validés *in vitro* sur les lignées tumorales pour leur propriété oncolytique. Une validation *in vivo* chez la souris est néanmoins indispensable pour apprécier l'interaction avec le système immunitaire et l'activité anti-tumorale de ces approches d'immunothérapie innovante. Le nombre de souris utilisées est réduit au maximum sans toutefois compromettre l'interprétation statistique des résultats obtenus. Une surveillance adaptée des animaux et une définition de points limites précoces permettent de limiter au maximum la souffrance des souris.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet : Nombre maximum de souris : 220

11383 Les maladies auto-immunes sont dues à un dysfonctionnement du système immunitaire qui s'attaque aux constituants normaux de l'organisme. Dans les pays développés, les maladies auto-immunes touchent environ 8% de la population avec une forte prévalence pour les femmes (78%). Ces maladies évoluent de façon chronique tout au long de la vie, avec des alternances phases de crises et de rémissions. A ce jour, plus de 80 maladies auto-immunes ont été décrites. Parmi les plus fréquentes, on peut citer la sclérose en plaque et la polyarthrite rhumatoïde. Les principaux traitements sont basés sur des médicaments appelés immunosuppresseurs. Les plus courants sont les corticoïdes, le cyclophosphamide, le methotrexate, l'azathioprine, la cyclosporine et plus récemment le mycophenolate mofétil. Malheureusement, ces traitements entravent également les réponses immunitaires physiologiques destinées à lutter contre les infections et ont d'autres effets secondaires potentiellement sérieux qui sont propres à chacun.

Le but de la recherche médicale est de mettre au point des traitements efficaces avec moins d'effets secondaires. La recherche est actuellement concentrée sur le développement de thérapeutiques dites « ciblées » c'est à dire qui vont interférer avec des fonctions précises de la réponse immunitaire, fonctions qui sont impliquées dans la pathogénie de la maladie. Afin de modéliser ces pathologies, différents modèles animaux existent et sont validés par la communauté scientifique. Ces modèles ont permis d'étudier les mécanismes physiopathologiques des maladies auto-immunes et permettent ainsi de développer de nouveaux traitements. Ils sont en général basés sur la stimulation d'une réponse immunitaire connue de la maladie. Par exemple, une stimulation des anticorps dirigés contre la gaine de myéline dans le cas de la sclérose en plaque ou une stimulation de l'anticorps dirigé contre le collagène type II (constituant à 95 % des collagènes du cartilage normal) dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde.

Dans ce projet nous utilisons 4 modèles de maladie auto-immunes pour évaluer l'effet de composé en développement dans le traitement de ces pathologies.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R,

Remplacement : aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. En effet, la réponse immunitaire implique des interactions multiples et complexes. Bien qu'il soit possible de disséquer les événements individuels en détail avec des études *in vitro*, toutes les interactions impliquées dans la réponse globale *in vivo* ne sont pas possibles à simuler *in vitro*.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesure sont mise en œuvre notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement adaptées (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté, présence d'enrichissement), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis. Les actions nécessitant une contention pouvant induire un stress à l'animal, elles sont réalisées sous anesthésie générale. Chaque fois que c'est possible la douleur est prise en charge par un traitement antalgique et dans tous les cas la durée de l'expérience est réduite au maximum.

Réduire : nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 10 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 à 15 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 3390 rats est envisagée.

11384 La maladie de Parkinson est une maladie neuro-dégénérative caractérisée par la destruction d'une population spécifique de neurones : les neurones à dopamine. Ces neurones sont impliqués dans le contrôle des mouvements.

La prise d'un médicament « L-DOPA » permet l'amélioration des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson mais s'accompagne toutefois d'effets secondaires délétères caractérisés par des mouvements involontaires anormaux ou dyskinesies chez 90% des patients.

Notre étude est basée sur l'utilisation du modèle rat permettant de reproduire des mouvements anormaux suite à un traitement à la L-DOPA de la maladie de Parkinson afin d'évaluer l'effet de nouvelles molécules pharmacologiques visant à réduire les dyskinésies.

Le principe repose sur l'injection intracérébrale d'une neurotoxine (18 animaux) qui cible et détruit les neurones dopaminergiques. Ces animaux rendus « parkinsoniens » sont ensuite sélectionnés en fonction des dyskinésies observés après un traitement chronique de L-DOPA.

12 animaux seront ainsi sélectionnés pour évaluer l'efficacité de deux nouveaux composés pharmacologiques sur les dyskinésies.

L'analyse des effets pharmacologiques sur le comportement moteur nous contraint à utiliser des animaux. Le remplacement et les modèles *in vitro* actuels ne pouvant répondre à notre question.

Dans le respect des 3 R et afin de réduire le nombre d'animaux tout en ayant assez de données pour établir des statistiques solides, un latin square sera réalisé sur 12 rats incluant les tests des composés à différentes doses et les contrôles.

Pour le respect du R de raffiner, nous avons vérifié qu'aucune donnée sur le composé n'entraîne une souffrance chez l'animal. Les souffrances liées aux chirurgies seront soulagées via des molécules les plus adéquates. Tout le long des expériences, plusieurs critères sont pris en compte pour suivre le niveau d'inconfort ou de souffrance des animaux et décider, le cas échéant, de procéder à l'arrêt de l'expérience si le point limite est atteint. Les animaux non sélectionnés seront réutilisés par une autre équipe dans le cadre d'étude pilote d'électrophysiologie utilisant le même modèle. A la fin de l'expérience, les 12 animaux sélectionnés sont euthanasiés de façon indolore pour des contrôles histologiques.

11385 Avec une survie de 8,1% à 5 ans, le cancer colorectal métastatique est un des cancers dont la mortalité est la plus forte. Les patients atteints par cette pathologie développent des résistances à la chimiothérapie, qui consiste principalement d'oxaliplatine. Dans notre laboratoire, nous avons sélectionné des lignées de cellules cancéreuses coliques résistantes à l'oxaliplatine (cellule ROX). Des études visant à identifier les acteurs impliqués dans cette résistance nous ont emmené à étudier l'effet d'autres molécules utilisées en chimiothérapie. Nous avons mis en évidence *in vitro* une sensibilité accrue de nos cellules ROX à la gemcitabine par rapport aux cellules sensibles à l'oxaliplatine. La gemcitabine est une drogue utilisée pour le traitement d'autres cancers tel que le cancer du pancréas. Ce projet de recherche a donc pour objectif d'évaluer chez des souris porteuses de tumeurs l'efficacité de la gemcitabine sur la progression tumorale comparativement à l'oxaliplatine. Ce concept s'inspire de la réutilisation d'anciennes drogues ainsi que de la médecine personnalisée. Les cellules seront xenogreffées par voie sous-cutanée chez des souris nude (immunodéprimées). Nous utiliserons un nombre de souris minimum mais nécessaire en termes de significativité statistique. Au total 320 souris au maximum sont prévues. Dans le souci du respect de la règle des 3R, l'injection des cellules tumorales sera réalisée sous anesthésie. L'évolution de la pathologie sera suivie selon une grille d'évaluation de la souffrance, incluse en annexe, permettant de définir les points limites. Une analgésie (buprenorphine) est prévue afin d'éviter toute douleur. Les souris seront logées selon les normes requises avec un enrichissement (copeaux de bois, coton pour la nidification) et en groupes de 4 à 6 individus par cage afin d'éviter le stress de l'isolement. Ce projet s'inscrit dans le développement de stratégies thérapeutiques personnalisées afin de contrecarrer le développement des résistances à la chimiothérapie conventionnelle.

11386 Avec le vieillissement de la population et l'incapacité du cartilage à se régénérer, les pathologies du cartilage sont de plus en plus fréquentes. En France, 5 millions de personnes sont concernées par cette pathologie. Au cours de la vie, des lésions surviennent généralement sur une matrice saine dans un contexte de traumatisme, d'activités sportives, de dégénérescence chronique ou d'anomalies de l'os sous-chondral. Actuellement aucune thérapie utilisée en pratique clinique ne permet la régénération d'un tissu cartilagineux originel.

L'objectif de ce projet est d'étudier le comportement d'un greffon cartilagineux après implantation en site sous-cutané chez la souris afin de valider la bio-compatibilité et le devenir de ces substituts

cartilagineux dans un contexte physiologique. Ces substituts cartilagineux ont été conçus *in vitro* avec une teneur normale en oxygène (21%) ou avec une teneur en oxygène appauvrie (5%) par ingénierie tissulaire par un processus d'impression 3D à partir d'une bio-encre à base d'alginate parfaitement biocompatible et de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) issues de moelle osseuse humaine.

Pour cela, 60 souris immunodéprimées (Souris NU(NCr)-Foxn1nu, athymiques) séparées en 5 groupes pour chaque temps d'étude (1 mois, 2 mois et 3 mois)

- groupe 1 : greffe sous-cutanée de substituts 3D sans cellules (témoin sans cellules)
- groupe 2 : greffe sous-cutanée de substituts 3D fonctionnalisés avec des CSMs issues de moelle osseuse cultivés pendant 56 jours avec une teneur normale en oxygène (21%) et un milieu non chondrogénique (témoin avec cellules)
- groupe 3 : greffe sous-cutanée de substituts 3D fonctionnalisés avec des CSMs issues de moelle osseuse cultivés pendant 56 jours avec un milieu non chondrogénique appauvri en oxygène (5%) (témoin avec cellules)
- groupe 4 : greffe sous-cutanée de substituts fonctionnalisés avec des CSMs issues de moelle osseuse cultivés pendant 56 jours avec une teneur normale en oxygène (21%) dans un milieu chondrogénique enrichi en TGF- β 1+BMP-2.
- groupe 5 : greffe sous-cutanée de substituts fonctionnalisés avec des CSMs issues de moelle osseuse cultivés pendant 56 jours dans un milieu chondrogénique enrichi en TGF- β 1+BMP-2 et appauvri en oxygène (5%).

Les animaux seront euthanasiés 1 mois, 2 mois et 3 mois après la greffe des substituts cartilagineux et les greffons seront prélevés pour des analyses macroscopiques, histologiques et immunohistologiques, scores histologiques semi-quantitatifs.

Les greffes sous-cutanées des substituts ne sont pas invalidantes pour l'animal et ne peuvent pas conduire à la mort de l'animal. Cependant nous surveillerons quotidiennement les animaux et les points limites. Ceux qui présenteront des anomalies du comportement (vocalise, cachexie) et/ou une perte de poids supérieure à 20% (sur une semaine sans reprise de poids) seront euthanasiés en conformité avec les recommandations éthiques. L'apparition d'une infection cutanée consécutive à l'intervention (en pratique quasi nulle) nous obligera aussi à mettre à mort l'animal.

Ce modèle animal est indispensable pour connaître la biocompatibilité et le devenir des greffons dans un contexte biologique. Enfin, dans un souci d'éthique, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum et est nécessaire et suffisant pour les études statistiques prévues. De plus, trois sites sous-cutanés de greffe sont prévus chez l'animal afin de réduire le nombre d'animaux. Des études préliminaires n'ont montré aucune différence quel que soit le site sous-cutané choisi. (Réduction). Ce modèle de greffe sous-cutanée chez la souris immunodéprimée est un modèle connu et maîtrisé par notre laboratoire. (Raffinement) Les souris seront hébergées dès leur arrivée par 2 dans des cages ouvertes conformes pour cette espèce (directive 2010/63/EU) et les souris seront replacées respectivement dans les mêmes cages après la chirurgie pour éviter tout phénomène de dominance et de bagarre. L'enrichissement du milieu se fera par la distribution quotidienne de quelques céréales et d'un morceau de papier essuie-tout. Cet enrichissement ne modifie en rien notre étude et apporte une distraction non négligeable à l'animal et renforce également positivement la relation expérimentateur - animal. A la fin de l'étude, tous les animaux seront euthanasiés selon la méthode réglementaire. Les substituts seront prélevés de façon à effectuer les études macroscopiques, histologiques et immunohistologiques, les scores semi-quantitatifs histologiques.

11387 La dépression, qui est aujourd'hui la maladie psychiatrique la plus répandue avec une prévalence de 6 à 10% en Europe, représente un problème majeur de santé publique. En dépit de cette fréquence élevée et du coût économique de sa prise en charge, la compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la dépression reste encore limitée à ce jour. En effet, il n'a toujours pas été expliqué l'ensemble des facteurs de risque, la résilience, les mécanismes de résistance aux traitements classiques qui permettraient le développement de traitements alternatifs.

De nombreuses données (obtenues notamment dans notre laboratoire) montrent que la composante inflammatoire et immunitaire (notamment via l'augmentation de la synthèse de molécules pro-inflammatoires) est impliquée dans le développement des symptômes dépressifs ainsi que dans la résistance aux traitements antidépresseurs. L'étude de la voie neuro-immunitaire (interaction entre systèmes immunitaire et nerveux) semble donc un candidat de choix pour le développement de nouveaux traitements alternatifs. Les données cliniques obtenues dans notre laboratoire ont grandement contribué aux connaissances actuelles sur le sujet. Par exemple, nous avons montré que l'immunothérapie par cytokine entraîne une dépression chez environ 50% des patients. Les objectifs de cette étude seront d'évaluer, à l'aide d'un modèle animal adapté, le rôle de l'inflammation dans un contexte sous-chronique (induisant un état de type dépressif chez la souris), ainsi que les mécanismes neurobiologiques et immunologiques impliqués. Plus précisément, nous évaluerons le rôle spécifique de l'enzyme indoléamine 2,3 - dioxygénase (IDO) au niveau cérébral dans la résistance aux traitements antidépresseurs dans un contexte d'inflammation sous-chronique. Pour cela, nous utiliserons un modèle d'inflammation sous-chronique chez la souris grâce à l'injection répétée d'une molécule pro-inflammatoire, nous permettant ainsi d'obtenir un modèle de "dépression inflammatoire". La complexité des mécanismes biologiques mis en jeu, notamment l'interaction entre le système nerveux central et la périphérie, oblige à utiliser un modèle animal car il n'existe pas à l'heure actuelle de technique de remplacement permettant d'étudier ces interactions (Remplacer).

Dans un premier temps, nous évaluerons deux molécules inflammatoires pour déterminer laquelle sera la plus efficace pour générer une dépression inflammatoire. Cette procédure nécessitera 12 animaux par groupe, soit un total de 36 animaux. Une fois cette étape validée, nous ferons une caractérisation comportementale (évaluation de l'état d'anxiété et dépressif de nos animaux, tentative de correction des troubles à l'aide de traitement antidépresseur et/ou anti inflammatoire), biochimique (évaluation de l'inflammation cérébrale et périphérique) et neuro-immunologique (rôle d'IDO dans la microglie et ses effets sur les populations neuronales adjacentes). En minimisant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et atteindre une signification statistique, nous estimons que 30 animaux par groupe expérimental seront nécessaires pour mener à bien notre projet. Ceci représente un total de 180 souris sur un an.

Afin de réduire au maximum la souffrance causée aux animaux, nous avons déterminé avec attention les points limites du projet, nous permettant le cas échéant, d'administrer un traitement de confort aux animaux, voire de les euthanasier si leur état ne s'améliore pas. Des carrés de coton ainsi que des igloos en carton seront placés dans chaque cage, afin d'enrichir leur environnement, réduire leur stress et optimiser leurs conditions d'élevage. Ainsi, nous respectons l'obligation réglementaire des 3 R : Raffiner, Remplacer et Réduire.

L'objectif à long terme de ce projet est de transférer les connaissances acquises chez le rongeur à l'Homme pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à améliorer l'état des patients dépressifs résistants aux traitements actuels.

11388 1-Objectif scientifique du projet : Notre travail vise à une meilleure compréhension des fonctions d'un gène particulier régulant l'intégrité neuromusculaire ainsi que du rôle du muscle dans la physiologie de l'organisme. Les muscles squelettiques composent environ 40% de la masse totale du corps et sont essentiels pour le maintien de la posture, la locomotion, la respiration et la production de chaleur. Les muscles sont également des régulateurs majeurs du métabolisme de l'organisme entier car ils sont un site majeur de stockage de glucose et un important réservoir d'acides aminés pour les besoins énergétiques des autres tissus. De nombreuses conditions pathophysiologiques induisent un déclin de la masse et des fonctions musculaires, telles que la sarcopénie au cours du vieillissement, les myopathies, l'immobilisation, cachexie, diabète, etc. Des traitements médicamenteux par les statines et glucocorticoïdes ont aussi des effets délétères sur les muscles. Les altérations musculaires ont des conséquences sociales et économiques majeures puisqu'elles entraînent dépendance, fragilité et mortalité. La compréhension des mécanismes impliqués constitue donc un enjeu majeur de santé publique. Dans ce projet, nous travaillons avec des souris génétiquement modifiées. En effet, la souris est un modèle mammifère indispensable

pour la recherche sur le muscle squelettique en raison de ses étroites similitudes génétiques et physiologiques avec les humains, et la facilité à manipuler son génome. Le modèle murin se révèle également être un modèle idéal pour caractériser et/ou découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour déterminer l'importance fonctionnelle de notre gène d'intérêt dans les muscles squelettiques, dont on sait qu'il est classiquement ciblé en médecine humaine pour le traitement de plusieurs maladies non musculaires, nous avons généré des modèles murins dans lesquels ce gène a été inactivé spécifiquement dans les muscles squelettiques. Ces souris développent une myopathie progressive avec des altérations physiologiques. Nous avons ainsi pu démontrer que les fonctions musculaires de ce gène sont non seulement essentielles pour l'intégrité musculaire mais également pour l'organisme entier. Nous cherchons maintenant à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués et à mieux caractériser les altérations progressives par une étude approfondie de plusieurs tissus (muscles, foie, os) et liquides biologiques (sang) dans ces modèles.

2- Retombées attendues : Grâce à cette étude réalisée sur les souris, nos travaux permettront (i) de mieux anticiper les effets secondaires liés à l'inhibition de ce gène en médecine humaine, (ii) de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des maladies neuromusculaires, (iii) de mieux diagnostiquer les pathologies neuromusculaires chez les humains.

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

Remplacement : Le modèle murin est l'unique moyen pour étudier les mécanismes induisant une myopathie et de caractériser les conséquences physiologiques chez les mammifères. En effet, des cultures de cellules musculaires ne représentent pas l'organisme entier dans lequel les interactions inter-organes sont nombreuses et nécessaires en particulier pour le métabolisme. Les cellules ne permettent pas non plus d'étudier les effets de l'inflammation, ni de la régénération, ni les mécanismes pathologiques intrinsèques des muscles et leur influence sur le reste de l'organisme. Néanmoins, nous utiliserons des cellules musculaires à chaque fois que se sera possible.

Réduction : Dans nos procédures, nous avons constitué des lots de souris de petite taille pour chaque analyse, calculés en tenant compte du poids et de la variabilité inter-individuelle de chacun de nos modèles génétiques et d'un nombre d'animaux suffisant pour pouvoir exploiter nos résultats avec des tests statistiques. Nous utiliserons un test non paramétrique de Kruskal-Wallis qui permet d'analyser plus de 2 populations indépendantes de petites tailles, suivi d'un test de comparaisons multiples. Nous utiliserons les souris mâles et femelles afin de réduire le nombre de portées nécessaires tout en formant des groupes homogènes de souris mâles ou femelles dans chacune des analyses. Nous prélèverons les organes, tissus et liquides biologiques sur un même animal pouvant servir à différentes analyses réduisant ainsi le nombre d'animaux nécessaires. Notre méthodologie est clairement définie et notre expérience des gestes expérimentaux devrait permettre de réaliser tous les prélèvements avec succès sur chaque animal. Nous estimons ainsi à 721 animaux le nombre maximum de souris utilisées sur une durée de 5 ans.

Raffinement : Un personnel qualifié s'assure du bien-être des animaux tout au long des procédures selon les exigences relatives au soin et à l'hébergement des animaux. Les modèles murins mutants développent une myopathie progressive qui, comme chez les humains va graduellement altérer leur aspect général, par l'apparition d'une scoliose et une allure amaigrie dues à une masse musculaire et grasseuse réduite. Les souris mutantes sont également de moins en moins vives au fil du temps du fait d'une plus grande fatigabilité musculaire. Nous plaçons dans les cages des sachets hydrogel et des croquettes classiques hydratées en plus de croquettes classiques non hydratées pour faciliter leur accès aux aliments si nécessaire. Bien que notre étude porte sur la caractérisation de la progression des altérations, nous ne laisserons pas la pathologie s'installer jusqu'à un niveau de sévérité qui compromettrait l'un des paramètres suivants : locomotion, respiration, alimentation, abreuvement, toilettage. Aussi, une surveillance quotidienne des animaux permettra de détecter une altération de l'un de ces paramètres ce qui nous conduirait à immédiatement à l'euthanasie de l'animal. Afin que les animaux continuent à former des groupes sociaux, les animaux sevrés ne sont pas isolés dans des cages différentes en fonction de leur phénotype, sachant que les animaux mutants ne sont pas en conflit de domination avec leurs congénères. Lorsque l'animal aura atteint l'âge requis par notre protocole, nous procéderons aux prélèvements de tissus et fluides biologiques. La majorité des animaux seront euthanasiés au

préalable. Pour certains, un prélèvement chirurgical sous anesthésie profonde sera fait éliminant ainsi toute douleur pour l'animal qui sera immédiatement mis à mort à la fin des prélèvements.

11389 Le projet consiste à tester l'administration de molécules (oligosaccharides (glycans) issus d'hémicellulose de bois résineux qui peuvent avoir un effet bénéfique sur le microbiote intestinal. Le projet est conçu en tenant compte des directives Européennes (voir Official Journal of the European Union L 276/33). : « Reduce, Refine, Replace ». En effet, tout d'abord, ce type d'étude ne peut être réalisé *in vitro*. Seul un organisme vivant permet d'étudier les interactions entre la flore commensale et le système immunitaire, nous ne pouvons donc pas Remplacer ce modèle d'étude. Nous avons également Réduit au maximum le nombre d'animaux par groupe et le nombre de groupes, et également chercher à optimiser les expériences pour obtenir un maximum de réponses tout en utilisant un minimum d'animaux. Le nombre de souris par groupe ne peut être d'avantage réduit, afin de permettre l'obtention de résultats statistiquement fiables. Enfin, en termes de Raffinement, les animaux seront élevés et hébergés en groupe avec enrichissement du milieu de vie. Un suivi quotidien du bien-être des animaux sera réalisé. Avant toute expérimentation animale, les oligosaccharides ont été analysés et purifiés pour enlever toutes molécules aux effets potentiellement toxiques. Puis ces oligosaccharides ont été étudiés *in vitro* sur des bactéries du système digestif pour sélectionner les meilleurs candidats, réduisant ainsi le nombre d'individus inclus dans l'expérimentation animale.

L'objectif de ce projet est de trouver une molécule améliorant la santé d'un individu via une modulation de sa flore intestinale. En effet le tractus intestinal héberge une communauté microbienne complexe qui joue un rôle central dans l'homéostasie intestinale et dans la santé humaine. Le déséquilibre microbien (appelé dysbiose) est à la base de plusieurs maladies intestinales et extra intestinales. La composition et la physiologie du microbiote intestinal est façonnée dans une large mesure par l'afflux de glycans dans l'intestin, principalement à partir des sécrétions de la muqueuse de l'alimentation et de l'hôte. Le microbiote confère de nombreuses capacités métaboliques complémentaires de celles de l'hôte tel que la capacité de décomposer un grand nombre de fibre alimentaires (polysaccharides) autrement indigestes.

Puisque les espèces microbiennes diffèrent dans leurs préférences de glycans, la consommation sélective de ces nutriments peut influencer les groupes microbiens qui prolifèrent et persistent dans le tractus gastro-intestinal. Ainsi, l'utilisation de glycans diététiques particuliers peut être à la base d'une stratégie non invasive pour moduler la composition et la physiologie du microbiote.

La biomasse végétale autre que le bois a été utilisée comme source d'oligomères de glucides avec des propriétés prébiotiques. En effet, les prébiotiques actuellement commercialisés avec un degré de polymérisation (DP) essentiellement inférieur à 10 proviennent principalement d'oligosaccharides et de polysaccharides simples présents dans les plantes. Jusqu'à présent, les propriétés prébiotiques de l'hémicellulose du bois sont décrites dans deux publications seulement, toutes deux à partir de 2012. Elles ont montré que le galactoglucomannane, l'hémicellulose prédominante dans l'épicéa de résineux (*Picea abies*), pourrait avoir des propriétés prébiotiques, permettant la croissance des bifidobactéries, et aussi qu'une fraction obtenue à partir d'hémicellulose de *Pinus pinaster* et composée de 14 hexoses acétylés était stimulante pour la population de bifidobactéries humaines. En conclusion, les propriétés prébiotiques des oligosaccharides dérivés d'hémicelluloses de bois demeurent inconnues dans une large mesure. Or ces molécules seront dans les années à venir disponibles en quantité industrielle, à bas coût et sans concurrence avec les cultures alimentaires grâce à l'industrie de la pâte de cellulose.

Nous avons voulu analyser l'effet des fractions d'hémicellulose de bois sur l'homéostasie du microbiome de l'intestin. Nous avons tout d'abord étudié l'effet des fractions d'hémicellulose sur quelques bactéries connues pour être bénéfiques ou nuisibles pour la santé humaine. La fraction sélectionnée suite aux tests *in vitro* nécessite maintenant une étude sur un microbiote complet dont la complexité ne peut être reproduite *in vitro*. Nous évaluons à $32+128 = 160$ le nombre de souris nécessaires à l'évaluation globale de l'évolution du microbiote.

11390 Le syndrome métabolique regroupe dans sa définition la présence de plusieurs anomalies métaboliques associées (obésité abdominale, hypertriglycémie, HDL-cholestérol bas, intolérance au glucose ou diabète de type 2, hypertension). Cette condition s'accompagne généralement d'une hépatopathie et résulte d'une altération du métabolisme glucido-lipidique qui permet l'installation d'un état inflammatoire chronique appelé stéatohépatite non alcoolique ou NASH. Cette condition est un vrai problème de santé, sans traitement véritablement efficace. De plus, il favorise une évolution vers des stades peu voire non réversibles comme la fibrose, la cirrhose et l'hépatocarcinome.

Le programme de recherche proposé a pour but de mieux comprendre le rôle physiologique de facteurs de transcription dans les cellules du foie et plus généralement dans le développement de la NASH et de la fibrose. Le développement de la fibrose étant conditionné par des interactions inter-cellulaires dans le foie, ce processus n'est pas reconstituable *in vitro* et exige donc l'utilisation de modèles animaux. La première partie du projet vise à étudier les mécanismes d'action de facteurs de transcription connus dans le développement de la NASH, les récepteurs nucléaires PPAR α et FXR. En effet, des médicaments ciblant ces facteurs de transcription sont en cours d'essai clinique et ont montré des résultats prometteurs pour atténuer la stéatohépatite et la fibrose. Cependant, leur mécanisme d'action ainsi que les types cellulaires hépatiques impliqués dans cette activité anti-fibrotique restent encore peu connus.

Pour la deuxième partie du projet, nous étudierons le rôle de nouveaux régulateurs transcriptionnels dans le développement de la fibrose. Des études menées au laboratoire sur des lignées cellulaires ont montré que ces facteurs jouent un rôle clef dans la synthèse de collagène de type I et III, acteurs majeurs de la fibrose hépatique. A ce jour, il n'existe aucune donnée permettant de documenter ce rôle. Pour cela, nous allons invalider l'expression de ces facteurs de transcription soit à l'aide de modèles transgéniques ou par des siRNA afin d'étudier l'effet de la perte d'expression de ces gènes sur la réponse à un agent pro-fibrotique.

Les objectifs de ce projet sont donc : 1) mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliquant les récepteurs nucléaires PPAR α et FXR dans les différents types cellulaires du foie. 2) mettre en évidence de nouveaux facteurs de transcription impliqués dans le développement de la fibrose. Le nombre total d'animaux concernant les différentes procédures de notre projet sur les 5 ans à venir est estimé à 1920.

Notre projet répond aux exigences des 3R. En effet, les expérimentations préalablement menées *in vitro* sur les lignées cellulaires (REMPACEMENT) ainsi que le développement d'un nouveau protocole pour obtenir différents types cellulaires à partir d'un seul organe (REDUCTION), nous permettent de définir les processus engagés dans la fibrose et donc de diminuer considérablement le nombre de souris utilisées. Les tests statistiques ainsi que l'expérience de l'équipe montrent que des groupes de 10 à 15 souris sont nécessaires pour avoir des résultats fiables et scientifiquement exploitables, limitant ainsi le nombre de souris à son strict minimum (REDUCTION). Les souris seront hébergées dans un environnement enrichi : 4 souris par cage ; présence de petite maison pour améliorer leur bien-être (RAFFINEMENT). Nous serons également attentifs à observer si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être animal (RAFFINEMENT). Un examen clinique sera mis en place afin d'évaluer le plus précisément possible les premiers signes de stress ou de douleur afin d'en limiter les conséquences. Dans le cas de traitements pharmacologiques, seuls les composés ayant démontré leur innocuité seront utilisés. Particulièrement, nous serons attentifs aux paramètres cliniques suivants, définissant les points limites :

-perte de poids de 15% ou plus déterminée après pesée des animaux (et, le cas échéant variations de l'ingestion de nourriture et d'eau) :

-apparence physique externe (une piloérection, un dos rond, signes d'infection, respiration anormale.)

-changement du comportement (hypoactivité, démarche anormale)

-réponses comportementales au stimulus externe

Les animaux présentant un de ces critères seront euthanasiés par dislocation cervicale après anesthésie gazeuse à l'isoflurane.

11391 Le projet concerne le développement d'un modèle expérimental permettant de mettre en évidence un rapport de causalité entre la présence d'un pathogène et le déclenchement d'une maladie chronique chez une espèce de carnivore domestique.

Il comporte une procédure expérimentale de gravité sévère et permet de suivre après infection l'apparition de la pathologie. Ce modèle pourra être utilisé par la suite pour tester des produits immunologiques permettant la prévention de cette dernière, pour laquelle aucun traitement préventif n'existe aujourd'hui.

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R) :

- Cette procédure ne peut pas être remplacée par des méthodes alternatives car elle concerne une pathologie chronique complexe et la mise au point d'un modèle d'efficacité n'existant pas aujourd'hui.
- Le nombre d'animaux envisagé par groupe est déterminé dans le but d'obtenir des données valides et d'identifier clairement la pathologie à un stade le plus précoce possible. Au total, sur 5 ans, un nombre maximum de 45 carnivores domestiques sera impliqué dans ce projet.
- L'hébergement des animaux en groupe en présence d'enrichissement limitera le stress
- Une utilisation conjointe d'anesthésique et d'analgésique, si nécessaire, garantira le bien-être animal.
- Des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux seront réalisés tout au long de l'étude
- Des points limites adaptés seront développés et appliqués afin d'éviter toute souffrance des animaux.

11392 L'obésité et surpoids confondus touchent près de la moitié des français. Cette pathologie est due à un déséquilibre de la balance énergétique correspondant à des apports alimentaires excessifs associés à une faible dépense énergétique. Il en résulte une prise de masse grasse importante ainsi que des complications physiopathologiques tel que le diabète de type 2 (DT2), à l'origine de conséquences cardiovasculaires et respiratoires. La prise masse grasse est influencée par de nombreux facteurs comme la prédisposition génétique, l'environnement, le statut hormonal de l'individu, l'alimentation, le manque d'activité physique et la sédentarité, mais aussi, directement ou indirectement, par la composition du microbiote intestinal. Le microbiote intestinal constitue en effet un écosystème complexe dont la diminution de la richesse et une altération de la diversité microbienne peut-être une des causes de l'obésité. En amont des prises en charge médicamenteuses voire chirurgicales de l'obésité, la mise en place de conseils et mesures hygiéno-diététiques (alimentation adaptée et/ou une augmentation du niveau d'activité physique) est à privilégier. Dans la littérature, la prise en charge par l'activité physique est reconnue comme plus efficace qu'un régime hypocalorique seul pour améliorer l'équilibre glycémique et la composition corporelle. Parmi les différentes modalités pouvant être proposées, les entraînements de type HIIT pour « High Intensity Interval Training » sont à présent privilégiés pour diminuer significativement la masse grasse totale et abdominale. De plus, ils permettent également d'impacter le métabolisme glucido-lipidique.

Des études récentes menées sur un complément alimentaire composé de plusieurs extraits végétaux, ont montré des effets bénéfiques sur l'évolution de la composition corporelle en diminuant la prise de masse grasse et sur le métabolisme glucidique en améliorant la sensibilité à l'insuline et en réduisant l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie. Le complément semble également améliorer la diversité de la flore intestinale et limiter en partie les altérations induites par un régime High Fat – High Sucrose (HF-HS) sur le microbiote.

Indépendamment les uns des autres, ces facteurs (l'activité physique et le complément) ont déjà démontré un effet bénéfique sur la composition corporelle, le DT2 et le microbiote intestinal. Dans

cette étude qui durera au total 28 semaines, 60 rats Wistar mâles âgés de 8 semaines hébergés en cage individuelle seront rendus obèses sur 16 semaines par un régime HF-HS, puis soumis, selon le lot, à la prise d'un complément alimentaire et/ou un exercice physique intense (HIIT) durant 12 semaines. Nous cherchons alors à juger des effets distincts ou associés du complément et du programme d'entraînement sur l'évolution de la composition corporelle, de l'équilibre glycémique ainsi que sur la composition du microbiote intestinal.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) pour l'expérimentation animale. Afin de comprendre les mécanismes sous adaptatifs au complément et/ou l'entraînement, nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation *in vitro*, *ex vivo* ou *in-silico*. Le nombre d'animaux par lot est toutefois limité au maximum (à partir d'un test de puissance en lien avec la littérature). Aucune procédure très douloureuse n'est prévue mais nous mettrons en œuvre des méthodes permettant de limiter au maximum toute éventuelle souffrance de nos animaux (mise en place des points limites, utilisation de cages adaptées, surveillance quotidienne des animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins ou d'exclusion d'animaux en souffrance).

11393 L'émergence des nouvelles technologies utilisant les radiofréquences (RF) (300 MHz-300 GHz) a pris une telle importance que nous sommes inévitablement exposés à ces champs électromagnétiques et que la question d'effets potentiels sur la santé se pose. Ces effets ont été largement recherchés jusqu'à aujourd'hui et parmi les sujets abordés leur éventuel effet toxique pour l'ADN des cellules, en association ou non avec d'autres agents toxiques. Aucun effet toxique n'a été démontré à ce jour sur l'ADN en dessous des valeurs limites d'exposition aux RF. En revanche, des études récentes suggèrent d'éventuels effets bénéfiques puisqu'une préexposition à un champ radiofréquence de type GSM-900 réduirait l'effet d'agents connus pour léser l'ADN comme les rayons X ou la bléomycine dans les cellules mononuclées du sang périphérique chez l'homme et dans différents tissus chez la souris.

Cette propriété est appelée réponse adaptative et est définie comme la capacité d'un organisme ou d'une cellule pré-exposée à une faible dose d'un agent à résister à une exposition à une dose plus élevée du même agent ou d'un autre agent.

Notre projet a pour but de déterminer si d'autres signaux RF, en particulier l'UMTS-1950 MHz, un signal RF de communication sans fil plus récent, sont capables d'induire une réponse adaptative chez la souris. Les animaux seront exposés corps-entier, libres de leurs mouvements, à ce signal à différents niveaux de puissance correspondant à la limite d'exposition pour le public (0,08 W/kg), à la limite d'exposition pour les professionnels (0,4 W/kg) et le niveau critique à partir duquel un échauffement mesurable des tissus est observé (4 W/kg, +1°C).

L'exposition sera de 3 h/ jour, 4 jours/semaine, puis les souris recevront une irradiation aux rayons X. L'organe ciblé sera le cerveau. Si la réponse adaptative est démontrée, il s'agira ensuite d'identifier le mécanisme responsable de cette réponse avec pour candidat, le phénomène d'autophagie. L'autophagie est un mécanisme cellulaire conduisant au recyclage de composés cellulaires et considéré comme un mécanisme majeur de protection des cellules face à un stress.

Pour ce projet, le nombre de souris Swiss mâles est estimé à 140 sur 30 mois et les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

- Réduire : Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux qui nous permet de réaliser tous les tests soit 8 souris par niveau d'exposition et un total de 80 souris pour l'identification de la réponse adaptative. La validation de la dose de rayons X optimale utilisera douze souris (gamme de 3 doses plus le contrôle avec 3 animaux par condition). Quarante-deux souris seront utilisées pour l'étude pilote de détection de l'autophagie. Six souris supplémentaires sont prévues en cas de mort naturelle prématurée. L'analyse statistique utilisée est le test de Kruskal Wallis.
- Raffiner : Les souris sont placées dans une cage en plexiglass (540 cm² au sol), avec 4 souris au maximum par cage. Les souris sont exposées dans ces mêmes cages, ce qui supprime la manipulation et évite donc de les stresser. Elles bénéficient d'un enrichissement avec une hutte en polycarbonate (rouge), ainsi que du matériel de nidification. Les conditions d'hébergement sont de

21±2°C, 55±5% d'humidité et un cycle jour-nuit (8 heures-20 heures). La salle dans laquelle sont exposés les animaux présente également une ambiance contrôlée. Une surveillance quotidienne est assurée par le personnel de l'équipe au cours de laquelle sont vérifiés :

- L'apparence physique externe, par exemple l'absence de signes d'agression (sang, morsure, lésions de la peau), les caractéristiques de la fourrure, qui doit être lisse et propre (blanche), etc.
- Les changements du comportement et de l'interaction avec les partenaires, par exemple l'agitation, la prostration, etc.
- Les réponses comportementales aux stimuli externes, par exemple, la réaction au bruit
- L'émission de cris anormaux
- De plus, la variation du poids de l'animal est surveillée avec une pesée quotidienne si les souris présentent des signes de souffrance.
- Remplacer : Remplacer le modèle animal n'est pas possible pour ce projet qui étudie des processus dynamiques dans le cerveau en particulier.

11394 Le syndrome de Bartter est une maladie rare qui s'associe à une perte rénale de chlorure de sodium et une hypotension. L'utilisation d'indométhacine (anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, permet de résorber la plupart des troubles associés à ce syndrome. Le mécanisme expliquant l'effet bénéfique de l'indométhacine n'est pas bien connu dans cette maladie. La première partie de ce projet a pour objectif de mieux caractériser un modèle murin d'inactivation d'un canal chlore et essayer d'améliorer la survie de ce modèle en utilisant les mêmes traitements que chez l'homme (utilisation d'anti-inflammatoires et compensation de la perte en sel). Ce projet permettra également de mieux comprendre les mécanismes qui entraînent une synthèse accrue de prostaglandines dans le syndrome de Bartter.

La souris est le seul modèle animal dont l'inactivation génique est particulièrement bien caractérisée. Ceci en fait un modèle de choix pour étudier l'implication d'une voie de transduction, une protéine ou un système hormonal dans la régulation physiologique de la balance sodée et de l'état acido-basique. Le recours à des méthodes alternatives a été envisagé en particulier des modèles cellulaires. Il n'existe pas de bon modèle cellulaire pour les cellules rénales.

Nous estimons au total que 696 souris seront nécessaires afin de faire cette étude comportant 3 procédures pour un programme de recherche de 5 ans. Nous adapterons le nombre d'animaux à la baisse dans le respect de la règle des 3R si les protocoles ou les résultats de nos expériences le permettent. Un enrichissement de l'environnement des animaux sera également entrepris. Nous limiterons au maximum le stress et l'angoisse des animaux grâce à des points limites suffisamment précoces. L'expérience sera interrompue si ces points limites sont atteints.

11395 Les cancers de la cavité orale et du pharynx sont un problème de santé publique puisqu'ils se situent au 5ème rang des cancers les plus fréquents chez l'homme avec 7600 nouveaux cas et 3270 décès en 2011 en France.

Les principaux facteurs de risque sont le tabac et l'alcool.

Le cancer de la cavité orale peut se développer à partir de lésions orales pré-malignes dont la plus fréquente est la leucoplasie orale. Cependant, nous n'avons pas aujourd'hui assez de connaissances pour prédire quelles lésions vont se transformer en cancer et nous ne disposons pas de traitement pour prévenir/empêcher cette transformation cancéreuse.

L'objectif notre projet est d'étudier l'effet thérapeutique d'une stratégie vaccinale sur la prévention des cancers de la cavité orale dans un modèle murin.

Le modèle de souris que nous étudierons est bien décrit dans la littérature. Nous utilisons un produit permettant d'induire des lésions orales précancéreuses qui par la suite se transforment en cancer. Ainsi, ce modèle reflète bien les étapes de la formation des cancers oraux chez l'homme. Ceci nous permettra donc de tester l'efficacité d'une stratégie vaccinale pour empêcher cette transformation.

Les vaccins qui seront étudiés ont déjà été testés pour d'autres cancers avec des résultats encourageants. L'effet thérapeutique des vaccins sera testé en comparant le pourcentage des différentes lésions observées chez 120 souris.

Au cours de l'élaboration de ce projet, nous allons veiller au respect de la règle des 3R, visant à :

1- "réduire" le nombre d'animaux en expérimentation : nous avons calculé le nombre minimum de souris à inclure, en prenant en compte notre expérience, les études déjà publiées utilisant ce modèle ainsi que pour de disposer de suffisamment de matériel biologique pour rendre nos résultats interprétables.

2- "raffiner" la méthodologie utilisée pour assurer le bien-être animal et éviter toute souffrance : tout au long de notre expérience, le suivi rigoureux des animaux permettra la recherche de tout signe de souffrance. Nous utiliserons anesthésies ainsi que des antalgiques pour éviter toute douleur. En cas de signe de morbidité trop importante, ceci conduira à l'arrêt anticipé de la procédure.

3- "remplacer" le modèle *in vivo* par des modèles "*in vitro*" ou *in silico* : le modèle murin de carcinogenèse est un modèle immunocompétent établi dans la littérature et représentatif des conditions humaines (similitudes de mécanismes physiopathologiques et moléculaires), et est le plus utilisé pour tester des agents thérapeutiques de chimio prévention. Aucun modèle *in vitro* ou *in silico* ne peut répondre à l'ensemble des besoins du projet.

11396 La transplantation d'organe chez un patient nécessite généralement l'utilisation de traitements immunosuppresseurs lourds essentiels à prévenir le rejet. Dans le cas des grands brûlés ou des patients atteints de maladies héréditaires, la greffe de peau s'appuie aujourd'hui essentiellement sur la reconstruction de peau *in vitro* à partir des cellules souches du patient, contournant ainsi le problème du rejet. Cette stratégie est cependant limitée par le délai très long nécessaire à produire suffisamment de peau, exposant le patient déjà fortement diminué à des risques d'infection pendant plusieurs semaines.

Pour contourner ce problème, nous souhaitons développer un modèle de greffe dans lequel les cellules greffées exprimeront un peptide immunosuppresseur (ISD) capable de prévenir le rejet de greffe. Ce peptide, initialement identifié par notre laboratoire chez les virus, permet à ce dernier de déjouer le système immunitaire de son hôte, et ainsi de persister chez l'hôte. Nous l'avons de plus exprimé dans des cellules cancéreuses, où il confère aux cellules la capacité de devenir invisibles au système immunitaire de la souris. Nous souhaitons alors démontrer que l'expression de l'ISD au sein du greffon permettra de diminuer le rejet de greffe et ainsi de limiter l'utilisation des traitements immunosuppresseurs. Pour cela, nous souhaitons utiliser le modèle de greffe de peau chez la souris, un modèle très utilisé pour l'étude du rejet de greffe. Nous souhaitons générer des souris génétiquement modifiées pour exprimer l'ISD, qui serviront de donneurs. Des prélèvements de peau issus de ces souris seront greffés sur des souris receveuses de souche incompatible avec le donneur. Nous analyserons ensuite la prise de greffe et la réponse immunitaire du receveur. La comparaison du rejet de greffe entre un greffon sauvage et un greffon exprimant l'ISD nous permettra d'estimer le potentiel immunosuppresseur de l'ISD. Ce projet devrait permettre, à terme, de produire des greffons susceptibles d'être acceptés par tout type de patients, et pourra être étendu à la greffe d'autres organes. Enfin, il nous permettra de mieux comprendre comment fonctionne l'ISD dans l'inhibition du système immunitaire et ainsi d'optimiser son mode de fonctionnement lors de la greffe.

Les mesures suivantes seront prises afin de respecter la règle des 3R. Remplacement : Le rejet de greffe est un processus immunologique complexe qui ne peut pas être récapitulé *in vitro* et nécessite donc l'expérimentation sur l'animal détenant un système immunitaire complet. Réduction : Le nombre d'animaux sera réduit au maximum (4 lots de 5 souris, soit 20 souris en tout pour le projet) tout en conservant un nombre suffisant de souris pour pouvoir observer une différence significative entre les groupes. Raffinement : La greffe sera pratiquée sous anesthésie générale et analgésie locale afin de réduire au maximum tout stress ou douleur éventuelle. Après l'opération, les souris seront surveillées quotidiennement afin de détecter et de soulager tout signe de douleur.

11397 Le bien-être des animaux d'élevage est un enjeu sociétal fort. Un préalable au bien-être est l'absence d'émotions négatives, telles que peur, frustration, ou la douleur, qui est le cas extrême d'émotion négative. De surcroît la douleur entraîne de moindres performances zootechniques et donc des pertes économiques pour l'éleveur. Or actuellement, pour la plupart des espèces d'élevage, les phénomènes douloureux restent mal identifiés, ce qui limite leur prise en charge. De surcroît, la douleur est associée à un état émotionnel négatif chronique qui se traduit par des comportements négatifs et des interactions de l'individu avec son environnement physique et social réduites. Chez les bovins malades, le rythme jour/nuit d'activité est moins marqué et les activités non prioritaires comme le toilettage individuel sont réduites. La cohésion du groupe peut aussi être affectée.

Le présent projet s'intéresse à la douleur chez les bovins afin de pouvoir mieux les soulager, et ainsi améliorer à la fois le bien-être de l'animal et ses performances zootechniques. Le modèle d'étude choisi est celui de l'inflammation de la mamelle, qui mime la maladie douloureuse majeure en élevage laitier (mammite) avec un fort impact à la fois sur la santé des animaux, l'économie de la filière et l'utilisation d'antibiotiques. En pratique, les traitements prescrits par les vétérinaires ne comportent pas de valence analgésique et la douleur associée à cette pathologie n'est généralement pas traitée.

Cet essai a pour objectif d'enrichir les connaissances sur i) les conséquences des mammites, et plus particulièrement de la douleur et l'inconfort qu'elles provoquent, sur le bien-être, la santé et les performances (reproduction et production) des vaches ; et ii) les avantages à court et à long terme du soulagement de la douleur avec les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) pendant l'inflammation mammaire.

Chaque animal sera soumis à une épreuve inflammatoire modérée dans un quartier sain de la mamelle. La moitié des animaux recevront une injection d'anti-inflammatoire non stéroïdien par voie Intra musculaire. Chaque animal sera suivi pour évaluer, par des méthodes d'observation directe et des mesures physiologiques non invasives, l'effet antalgique du traitement et les modalités d'expression de la douleur provoquée par l'inflammation mammaire. Nous étudierons plus particulièrement les interactions des vaches laitières avec leurs congénères au sein du troupeau, leur état émotionnel, leurs interactions avec l'homme, leur activité, leur réponse physiologique, leur santé et leurs performances zootechniques au cours de la lactation.

Le comportement est l'indicateur de choix pour détecter précocement la douleur ou les troubles de santé. Nous souhaitons effectuer cette étude en stabulation libre pour pouvoir étudier l'ensemble des comportements des vaches dans un espace suffisant ce qui serait innovant.

REDUIRE : Sur la base d'une analyse statistique préalable, un total de 30 vaches laitières primipares en lactation est prévu pour réaliser ce projet. Une phase pilote préalable (2 bovins) permettra de préciser, en situation réelle, les modalités exactes d'observation et de prélèvement, avant de débiter l'étude avec 28 bovins répartis en deux groupes expérimentaux ; l'effectif de chaque groupe est le minimum nécessaire à une interprétation statistique.

RAFFINER : Les animaux seront logés en stabulation libre respectant leur bien-être : ils seront maintenus en groupe social stable, auront accès à des zones de couchage, d'alimentation et d'abreuvement conformes aux besoins de leur espèce, ainsi qu'à des brosses. A la fin de l'étude, ces bovins rejoindront leur troupeau d'origine.

REMPLETER : il n'est pas possible de remplacer l'espèce car cette étude de comportement sera effectuée sur l'espèce cible (bovin).

Si le niveau de douleur engendré par le traitement dépasse les points limites, il sera fait appel au vétérinaire praticien habituel intervenant sur ce troupeau qui sera chargé de prescrire le traitement antalgique approprié et, l'animal ainsi traité sera sorti de l'étude. Les animaux présentant des troubles de leur état de santé prolongés au-delà de 24h. Si la douleur des animaux non traités par un anti-inflammatoire s'avérait trop importante, les animaux seraient aussi traités par un analgésique et retirés de l'étude. Toutes les mesures seront prises pour permettre à la vache de reprendre une vie normale et produire à nouveau du lait dans le troupeau de notre établissement.

A terme, ces connaissances permettront d'identifier de nouveaux indicateurs d'évaluation de la douleur, basés sur les interactions entre bovins, avec l'homme, ou avec des éléments de l'environnement procurant des émotions positives. Ces connaissances permettront d'inciter une évolution des pratiques vétérinaires allant plus vers une meilleure gestion de la douleur provoquée par les inflammations mammaires.

11398 L'objectif de ce projet est de proposer au personnel des établissements utilisateurs d'animaux, une formation professionnelle continue (avec délivrance d'une attestation de participation à la formation) sur une technique chirurgicale spécifique sur le rongeur. Ce projet s'inscrit dans le cadre de l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques qui stipule la nécessité pour ce personnel de bénéficier d'une " formation continue dans les domaines liés à leur pratique professionnelle [...] pour assurer le maintien des compétences".

L'éthique de l'expérimentation animale fondée sur le principe des 3R est la pierre angulaire de tout projet au sein de notre structure. Dans la directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, il est mentionné que "le bien-être des animaux utilisés dans des procédures dépend grandement de la qualité et des compétences professionnelles du personnel qui supervise les procédures, qui mène les procédures ou qui supervise les personnes chargées des soins quotidiens aux animaux." Afin de prendre en compte cette directive et de répondre au plus près au besoin en formation des professionnels travaillant auprès des animaux, en optimisant le principe de réduction et de raffinement, nous souhaitons créer différentes formations ayant pour objectifs généraux l'évolution des compétences dans différents thèmes liés à la chirurgie appliquée aux rongeurs ainsi que l'évolution des comportements lors de ces actes.

Le projet consiste en une formation avec apprentissage *in vivo*, abordant une technique chirurgicale spécifique, la perfusion *in vivo* du pancréas, sur les rongeurs (rats et souris). Cette technique de pointe permet une étude très complète de la fonction du pancréas et de l'effet de traitement ayant pour but d'améliorer la fonction de cet organe. Cette formation comportera également des apports en connaissances théoriques (anatomie). Elle se déroulera durant 5 jours à raison de 6H/jours. Les séances d'apprentissage *in vivo* comporteront deux étapes : la pratique et un temps de débriefing sur les connaissances et les problèmes rencontrés. Au maximum 10 formations (10 participants/formation) seront proposées par année (5 formations rat et 5 formations souris). Chaque formation nécessitera 2 rats/participant/jour ou 3 souris/participant/jour durant les 5 jours de formation. Pour une demande d'autorisation sur cinq ans, ces formations nécessiteront au maximum 2500 rats et 3750 souris.

Ce projet consistant à former du personnel sur des techniques chirurgicales sur le modèle rongeur (Rat et souris), l'utilisation d'animaux est indispensable car aucune technique alternative n'existe concernant ces approches (principe de remplacement). Principe de réduction : Cette demande rentrant dans le cadre de la formation d'une technique chirurgicale spécifique, aucune étude statistique ne sera faite. Pour la même raison, aucun plan d'expérience n'a été réalisé afin de déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour le projet. Néanmoins, de par l'expérience de l'équipe formatrice et de sa maîtrise de la technique à enseigner, il ne sera pas nécessaire d'utiliser plus de 2 rats et 3 souris (chirurgie plus difficile que pour le rat) par jour sur 5 jours pour un apprentissage optimal de celle-ci. Par ailleurs, en fonction du niveau du stagiaire, le nombre d'animaux utilisé pourra être ajusté mais avec un maximum de 2 rats et 3 souris par jour de formation. Ainsi, pour les manipulateurs nécessitant de beaucoup de temps pour réaliser la chirurgie, le nombre d'animaux utilisé par jour pourra être revu à la baisse. Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement : les animaux auront accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire. Enfin,

l'ensemble des manipulations seront réalisées par des personnes diplômées en expérimentation animale et compétentes dans le domaine.

11399 Le sepsis est une affection médicale sérieuse caractérisée par des réponses inflammatoires systémiques dérégulées en réponse à une infection, conduisant à un dysfonctionnement d'organes, suivies d'une phase d'immunodépression responsable d'une susceptibilité accrue au développement d'infections secondaires. Malgré une prise en charge précoce des patients (antibiotiques à large spectre, réanimation hémodynamique, etc.), le sepsis reste associé à un taux de mortalité important dans les unités de soins intensifs (20-40% des patients septiques 28 jours après le sepsis et 50-70% dans les mois suivants) essentiellement dû à l'incapacité du système immunitaire du patient immunodéprimé à répondre contre de nouvelles infections. Rétablir l'homéostasie du système immunitaire du patient septique représente donc un enjeu capital.

Le modèle animal est le seul modèle actuellement pour étudier le système immunitaire et reproduire la complexité de la dynamique du sepsis qui englobe à la fois des mécanismes hémodynamiques, biochimiques et immunologiques.

Différents modèles animaux ont été décrits pour étudier ce syndrome dont la dynamique reste encore complexe. Un modèle murin est particulièrement décrit pour reproduire le plus fidèlement possible les statuts immunologiques, hémodynamiques et biochimiques observés chez l'Homme. Il s'agit du modèle CLP, basé sur la ligature et la perforation du cæcum sans obstruer l'intestin des animaux. Ce modèle combine la nécrose tissulaire et le sepsis polymicrobien mimant fidèlement les ruptures d'appendice et les diverticulites perforées rencontrées chez l'Homme. De plus, il s'agit du seul modèle dans lequel coexistent les deux phases clés du sepsis : la phase inflammatoire dérégulée conduisant au dysfonctionnement d'organe(s) et la phase d'immunodépression responsable d'une incidence accrue aux infections secondaires.

Lors d'une première étape, le modèle CLP a montré l'induction de paramètres caractéristiques de l'immunodépression observés chez le patient septique. L'objectif de cette nouvelle étude est de caractériser l'évolution de l'immunodépression au cours du temps dans ce même modèle. Cette étude s'inscrit dans un projet de recherche global visant à développer de nouveaux traitements de l'immunodépression induite par le sepsis.

Règle des 3R : Le bien-être des animaux reste au cœur de nos préoccupations. Un suivi des symptômes de mal-être des animaux aura lieu deux fois par jour et tout au long de la procédure afin de limiter au maximum leur souffrance et d'intervenir de manière appropriée et rapide pour les soulager. Des points limites adaptés au modèle CLP ont été définis. Les signes cliniques et la fréquence de suivi ont été adaptés en fonction de l'état général des animaux observé lors de l'étude précédente. Les analgésiques appropriés seront utilisés tout au long de la procédure. Les cages des animaux seront placées dans une armoire chauffante a minima jusqu'au réveil des animaux. Des aliments et de l'eau gélifiés seront déposés à différents endroits de la cage pour faciliter l'alimentation des souris. Selon les données de la première expérience, le nombre d'animaux sera réduit dans le second protocole.

Ce projet inclura un maximum de 90 souris qui est le nombre minimum d'animaux nécessaire pour pouvoir conclure sur la bonne reproduction du modèle.

11400 La pléthysmographie sur animaux vigils et non contraints et la mesure des oscillations forcées sur animaux anesthésiés sont des méthodes standard pour étudier la fonction pulmonaire chez les rongeurs de laboratoire. Ces techniques mesurent les variations de débit et de pression qui se produisent avant et après l'exposition à un médicament ou toutes autres provocations.

A l'heure actuelle, seule la mesure directe sur animal vivant permet de mettre en évidence l'absence d'effet, un effet bénéfique ou délétère d'un candidat médicament sur la fonction pulmonaire. Aucun modèle alternatif n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre d'étudier la fonction pulmonaire.

Notre objectif est de mesurer l'effet de produits pharmacologiques en cours de développement, candidats-médicaments, sur la fonction pulmonaire chez la souris dans le but de mettre en évidence des traitements minimisant l'impact ou rétablissant la fonction respiratoire normale.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons la souris, car la fonction pulmonaire de cette espèce animale est sensible aux médicaments et autres stimulus. A ce jour, aucun modèle alternatif n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre d'étudier la fonction pulmonaire. Pour cette raison, une approche *in vivo* est nécessaire pour étudier les candidats-médicaments.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes, dans des cages enrichies de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi régulier de la boisson, de la nourriture et de l'état des animaux.

La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal pour visualiser tout signe d'inconfort imprévu qui nécessiterait l'euthanasie de l'animal.

Réduire

La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles.

Nous avons montré de par notre expérience antérieure que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet d'obtenir un modèle reproductible avec 8 souris par groupe.

Nous proposons d'utiliser un protocole utilisant : un groupe témoin, un groupe recevant le candidat-médicament et lorsque c'est nécessaire, un groupe témoin stimulé, et un/des groupe/s thérapeutique/s avec administration du candidat-médicament, à une/des doses croissantes chez des souris stimulées.

Il est prévu d'évaluer l'activité de 6 candidats-médicaments à une dose unique par an (soit un maximum de 8 souris x 4 groupes = 32 souris, un total de 192 souris par an pour 6 candidats médicaments). L'activité des 5 à 6 candidats médicaments les plus actifs sera étudiée plus précisément en utilisant des doses croissantes (l'effet sera mesuré à 3-5 doses, soit un maximum de 8 souris x 8 groupes = 64 souris par candidat médicament, un total de 384 souris pour 6 candidats-médicaments). Nous envisageons donc l'utilisation d'un maximum de 1344 souris sur une période de 5 ans.

11401 Ces projets ont pour objectif d'étudier l'organisation anatomique des réseaux neuronaux au sein du système nerveux central (SNC), pour mieux comprendre le fonctionnement de populations neuronales dans des conditions normales ou pathologiques. Pour établir une cartographie d'un réseau de neurones, il faut utiliser un traceur capable d'envahir successivement des populations neuronales reliées synaptiquement entre elles. C'est le cas du virus de la rage (RV) qui infecte uniquement les neurones dans le SNC (virus neurotrope), ce qui en fait un outil extrêmement performant pour ce type d'études. Toutes les manipulations sont réalisées en laboratoire à niveau de sécurité adaptée (L2).

Cette demande d'expérimentation inclue quatre projets qui ont été rassemblés ici à cause de la similarité des objectifs de recherche (traçage de réseaux neuronaux), des animaux utilisés (souris) et des méthodes (utilisation du virus de la rage). Deux projets sont réalisés sur des modèles animaux de pathologies, avec pour objectif de définir les altérations des réseaux neuronaux lors du développement de la maladie. Les deux autres projets sont réalisés sur des souris saines, et leur objectif est de faire découvrir les réseaux de neurones impliqués dans des fonctions particulières (avancée des connaissances). Pour réaliser ces expériences, nous utilisons des souris de différents âges : de P0 (jour de la naissance) à P21 (souris de 21 jours) pour étudier les aspects développementaux, et des animaux adultes pour étudier les réseaux neuronaux matures.

Le nombre total d'animaux utilisés pour ces projets est 305. Pour ce qui concerne la règle des 3Rs, le remplacement de ces expériences sur animal par une approche *in vitro* n'est clairement pas envisageable, puisque le but de ces projets est d'analyser les connexions entre neurones au sein du SNC. Etant donné la méthode d'étude (virus de la rage) le remplacement n'est pas envisageable. Sur l'aspect réduction, pour valider une condition expérimentale, des méthodes statistiques ont révélé qu'il faut au minimum 6 animaux par groupe. Enfin sur l'aspect raffinement, les souris aux stades P0 et P6 ne sont endormies que quelques instants par hypothermie, pour permettre une injection intramusculaire de virus. Après réchauffement, ils sont remis avec la mère et la prise de poids durant la période d'incubation est un indice d'un état général satisfaisant des bébés. Pour les animaux adultes, bien que les méthodes soient peu invasives, pour réduire la douleur, nous procédons à une analgésie en plus de la sédation. Pendant la période d'incubation post opératoire (24 à 72h) les animaux sont observés de façon à déceler toute forme de souffrance (poil hérissé, prostration, perte de poids), en utilisant la grille d'évaluation de la douleur de Morton et Griffiths.

11402 Certaines cellules du système immunitaire peuvent aider à lutter contre le cancer alors que d'autres en favorisent la progression. Parmi ces cellules, notre étude se focalise sur les Th17 (T helper sécréteurs d'IL-17) qui peuvent avoir un rôle ambivalent. En effet, dans certains contextes, les Th17 peuvent aider l'organisme à lutter contre la tumeur et dans d'autres cas, ils deviennent l'allier de la tumeur et l'aident à progresser. Notre équipe a déjà montré que les tumeurs, par leur production de TGFb, sont capables de changer les Th17 anti tumoraux (nommés Th17anti le reste du document) en Th17 protumoraux (Th17pro). Grâce à des études que nous avons menées *in vitro* nous avons identifié une molécule qui pourrait être utilisée comme une cible thérapeutique pour transformer les Th17pro en Th17anti.

Pour évaluer la pertinence de nos observations *in vitro* nous avons généré des souris génétiquement modifiées déficientes pour notre molécule d'intérêt. Nous allons étudier si les tumeurs que nous injectons poussent moins vite dans ces souris dans 2 modèles : tumeurs sous cutanées et tumeurs pulmonaires. En effet, le recrutement des globules blancs est différent selon le site de la tumeur. Pour comprendre si les observations obtenues *in vitro* sont vraies *in vivo*, nous sacrifierons ces souris et étudierons leurs Th17 mais aussi les autres globules blancs pour savoir si d'autres modifications sont associées. De plus pour que nos résultats soient au plus proche de la réalité nous utiliserons également un modèle de cancer induit par des produits chimiques.

Pour déterminer le potentiel anti tumoral des cellules Th17pro déficientes pour notre molécule, nous essaierons de soigner des souris par thérapie cellulaire. Nous injecterons des cellules Th17pro déficientes pour la molécule, générées en laboratoire à des souris porteuses de tumeurs B16F10 et nous évaluerons l'impact sur la progression tumorale. Pour comprendre les mécanismes, nous utiliserons des anticorps bloquant les différentes molécules en relation avec les Th17 pour savoir laquelle est impliquée.

Pour savoir si le développement d'un médicament est pertinent nous avons fait générer des souris pour lesquelles la déficience de la molécule est induite par un traitement. Ce modèle nous permettra de cibler spécifiquement la molécule dans des souris qui présentent déjà une tumeur palpable. Nous pourrions alors observer si cibler la molécule chez un individu après diagnostic du cancer a un intérêt.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront répétées que deux fois et les rates et les tumeurs seront analysées sur les mêmes animaux ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. De plus, nous avons fait appel à une méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants. Des études préliminaires ont été réalisées sur les cultures de cellules *in vitro* limitant ainsi l'utilisation d'animaux (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections sous-cutanées des tumeurs et euthanasie) sera réalisée sous anesthésie permettant ainsi le raffinement de l'étude. Cette étude nécessitera 780 souris.

11403 Dans notre société actuelle, le besoin et la volonté de réduire les douleurs sont très importants. Si de nombreux analgésiques sont disponibles sur le marché pharmaceutique, certains peuvent présenter des effets indésirables comme les dérivés morphiniques avec les phénomènes de dépendance. D'autres peuvent n'être efficaces que sur des douleurs de types inflammatoires et être complètement inutiles pour traiter des douleurs neuropathiques (paracétamol, aspirine.).

De plus les causes de la douleur sont très diverses : fracture, inflammation d'un tissu, lésion d'un nerf, les conséquences de médicaments anti-cancéreux ou le diabète, HIV.

L'identification de nouvelles molécules analgésiques est un axe important de l'industrie pharmaceutique et de certains laboratoires de recherche fondamentale.

Un nouveau D-peptide ciblant le canal calcique de type N Cav2.2 a été identifié. Des études précédentes ont déjà montré l'efficacité de ce peptide sur deux modèles de douleur neuropathique (SNL et SNI) avec des concentrations élevées.

Afin de déterminer la dose d'efficacité 50% de cette molécule (ED50), deux modèles impliquant le système nerveux sensoriel périphérique seront utilisés avec des concentrations plus faibles : le test du tail-flick et le test formaline.

Le test de tail-flick est basé sur l'arc réflexe au niveau de la moelle épinière et permet de valider si l'information sensorielle périphérique est bloquée à ce niveau-là.

Les informations de pharmacocinétique disponibles indiquent que la concentration maximale de la molécule est atteinte à 1h, et son niveau reste encore important 6h après administration. Des mesures répétées (time-course) seront donc effectuées jusqu'à 2h après traitement, puis ensuite analysées avec les tests statistiques adéquates.

Ce premier test étant non invasif, les animaux utilisés pourront être utilisés pour le second test avec deux semaines de repos.

La douleur provoquée lors du test formaline est bi-phasique avec une première phase s'étalant sur les 10-15 premières minutes qui correspond à l'activation directe des neurones sensoriels, puis une seconde phase qui est due à la sensibilisation du réseau neuronal au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Les résultats seront analysés avec les tests statistiques adéquates.

Les tests utilisés impliquant des réponses intégrées (système sensoriel périphérique, réseau neuronal au niveau de la moelle épinière), ces tests ne peuvent malheureusement pas être remplacés par des techniques alternatives de culture in-vitro.

Nous avons établi le nombre d'animaux nécessaires (10 animaux) pour chaque groupe en utilisant le logiciel SigmaPlot avec une différence significative ($p < 0.05$) pour une puissance de 90% pour l'ANOVA en ayant 6 groupes différents (un groupe contrôle positif, un groupe contrôle négatif et 4 groupes avec 4 concentrations différentes).

En tout, nous aurons donc besoin de 60 souris C57Bl6 qui réaliseront le test du tail-flick (non invasif) puis le test de formaline avec un temps de repos de 2 semaines.

Les personnes affectées au projet sont formées et qualifiées à l'expérimentation animale : 2 chercheurs ayant suivi la formation B. Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant le raffinement de l'environnement. Nous utilisons alternativement des carrés de ouates pour que les animaux puissent faire un nid, des petits morceaux de bois ou des dômes en cellulose, qui sont changés chaque semaine. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et 5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et environnemental des animaux est contrôlé. Des points limites sont définies et seront contrôlés tout au long du projet.

11404 Au cours de ces dernières décennies, l'augmentation des activités humaines a entraîné l'exposition des populations animales à des milliers de polluants. Parmi les milieux aquatiques d'eau douce, les zones humides sont des écosystèmes complexes exposés à l'accumulation de xénobiotiques. Dans ces zones humides, un déclin dramatique des populations d'amphibiens a été observé au niveau mondial depuis les années 80. La multipollution par les perturbateurs endocriniens (PE), en

combinaison avec d'autres facteurs, semble jouer un rôle prépondérant dans ce phénomène comparant les amphibiens à des sentinelles environnementales. Cependant ce statut est aujourd'hui remis en cause par certains scientifiques qui pensent que les amphibiens ne sont pas plus sensibles à la pollution que d'autres espèces. Ainsi, le déclin des populations d'amphibiens a été imputé par de nombreux auteurs à d'autres facteurs comme la perte d'habitat ou encore l'émergence de nouvelles maladies. Les PE apparaissent alors comme des facteurs de second plan qui exacerbent l'effet des facteurs prépondérants. Dans ce contexte polémique, l'impact réel des PE seuls ou en mélange sur les amphibiens doit être étudié plus en détail. Les PE sont des composés exogènes ayant la capacité de perturber les régulations hormonales. Chez les vertébrés, ils ont été massivement étudiés pour leur capacité à interférer avec le développement des organes reproducteurs et la différenciation sexuelle. Un grand nombre de publications démontre des perturbations du système reproducteur chez les amphibiens provenant de zones polluées. Cependant des études récentes suggèrent que les PE peuvent également entraîner des désordres métaboliques. Une étude récente de dans notre laboratoire a démontré que le benzo[a]pyrène (BaP) est capable d'induire d'importants désordres métaboliques chez le xénope tropicalis caractérisés par un phénotype d'insulino-résistance-like au niveau transcriptomique. Sur le long terme, de tels effets métaboliques peuvent conduire à une perturbation de l'énergie allouée à la reproduction et avoir un impact significatif dans le déclin des populations d'amphibiens. Dans ce contexte et compte tenu du fait que les PE semblent pouvoir agir à la fois comme perturbateurs des fonctions reproductrice et métabolique, l'importance relative de ces deux phénomènes et leur synergie possible dans le déclin des populations d'amphibiens doivent être étudiées plus en détail. Ce projet se propose de mesurer l'effet des polluants sur le métabolisme énergétique hépatique et sur la physiologie pancréatique.

Pour l'ensemble de cette étude 72 animaux seront utilisés. Cependant, après euthanasie des animaux, l'ensemble des organes seront prélevés. Pour cette procédure, seul le foie et le pancréas seront utilisés pour les études de transcriptomique, mais le fait de récupérer tous les autres organes nous garantira l'étude de l'impact des xénobiotiques sur l'ensemble de la physiologie de l'animal sans avoir à réexposer d'autres animaux.

Les manipulations réalisées sur ces animaux ne peuvent pas être substituées par des manipulations sur cultures cellulaires car les effets observés sont le jeu d'actions et d'interactions entre différents organes et systèmes (Remplacer). Les protocoles d'exposition mis en œuvre permettent de mimer les conditions du milieu (exposition par l'eau) pour confirmer et transposer les résultats obtenus à court terme sur le terrain. Ce genre d'exposition n'entraîne pas de souffrance chez l'animal contrairement à l'injection de polluant par voie intrapéritonéale classiquement utilisée en toxicologie (Raffiner). Le nombre d'animaux utilisé est le nombre minimum pour permettre l'analyse statistique des résultats. Les animaux utilisés pour les tests de tolérance au glucose, pyruvate, insuline, seront également utilisés pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires (Réduire). Des points limites définis à partir de la présence éventuelle d'inflammation cutanée ou de rougeurs et de leur importance permettront de procéder à l'euthanasie des animaux afin de limiter la souffrance ou la douleur occasionnée.

11405 Le grand âge, la sédentarité et la maladie peuvent induire une sarcopénie (perte de muscle), une ostéopénie (perte d'os, qui précède l'ostéoporose) et souvent les deux (ce qu'on appelle une ostéo-sarcopénie). Cette condition diminue la qualité de vie, impacte l'indépendance du sujet et augmente la comorbidité, tout en diminuant l'espérance de vie. Il n'existe pas de traitement pour prévenir la sarcopénie et l'ostéoporose.

Une hormone produite par l'intestin, le FGF19, régule le muscle et accroît ses performances chez des souris saines et malades. Les cellules de l'os de la souris ont le potentiel de répondre elles aussi à ce stimulus hormonal. Nous voulons dévoiler le rôle et mode d'action du FGF19 dans le squelette, pour tester l'hypothèse que cette molécule peut agir comme agent anti-sarcopénique ET anti-ostéopénique.

Cependant, des données préliminaires à l'échelle de l'organisme entier sont nécessaires pour corroborer cette hypothèse avant de procéder à des études plus approfondies.

Nous voulons évaluer l'impact d'un traitement avec le FGF19 sur la densité et la qualité de l'os et sur le métabolisme, et le comparer au placebo. Nous utiliserons un modèle de souris déjà utilisé dans d'autres laboratoires, qui étudient les réponses du muscle au FGF19. Nous analyserons la physiologie squelettique et le métabolisme des souris, avec des examens très peu invasifs sur l'animal vivant (prise de sang, densitométrie osseuse).

L'étude des réponses du système squelettique à une hormone telle que le FGF19 ne peut se concevoir qu'à travers une analyse systémique globale, tant les liens entre métabolismes énergétique, musculaire et squelettique sont étroits.

Cette étude ne peut pas être réalisée *in vitro* ou chez l'Homme :

- *in vitro* : car c'est l'interaction entre l'os, les muscles et autres organes impactés par le FGF19 (comme le foie) qui est étudiée ici, sous l'influence de facteurs locaux et systémiques, visible qu'à l'échelle de l'organisme entier. Des cultures cellulaires ne pourraient donc pas nous donner ce type d'information.

- chez l'Homme : car l'utilisation du FGF19 n'est pas encore autorisée pour l'homme.

Afin de mener à bien ce projet, 20 souris C57Bl6/j mâles adultes, matures sur le plan squelettique, seront nécessaires. Ce nombre comprend les animaux pour effectuer les deux différents groupes soumis aux traitements pharmacologiques, notamment FGF19 et le placebo.

Ce nombre ne peut-être plus diminué sans risque de mettre en péril l'interprétation statistique. Le suivi dans le temps des paramètres osseux par densitométrie osseuse, avant et après traitement, est particulièrement puissant d'un point de vue statistique et cela nous permet de minimiser le nombre d'animaux nécessaires.

Le projet ici proposé se base sur les résultats d'études précédentes, menées ailleurs mais aussi dans notre équipe.

Lors de la réalisation de cette étude, chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérés grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgesie).

Les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 4-5), dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger) dans une salle aménagée pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux. Eau et nourriture sont mises à disposition "*ad libitum*".

11406 La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative progressive qui est caractérisée dans ses stades précoces par des altérations de la mémoire en relation avec des déficits de la plasticité synaptique dans l'hippocampe, une zone cérébrale clé dans l'encodage et le traitement de différentes modalités mnésiques. Ce projet de formation concerne la caractérisation des symptômes, ainsi que des propriétés des circuits neuronaux impliqués dans la mémorisation de type épisodique chez la souris.

Ce projet utilise des approches fonctionnelles (imagerie cérébrale, biochimie, etc) et comportementales. Il fait appel au transfert de gènes *in vivo* et à l'utilisation, de souris génétiquement modifiées comme modèles de maladie neurodégénératives.

Dans ce projet de formation, nous utiliserons un nombre total de 360 souris sur 5 ans.

Dans le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) les mesures suivantes seront prises : (1) un même animal sera utilisé pour différentes procédures afin de réduire le nombre total (réduction) ; (2) Les protocoles comportementaux seront suivis par des analyses immunohistochimiques afin de réduire

et d'optimiser l'utilisation des animaux (réduction) ; (3) les méthodologies utilisées dans ce projet impliquent la mise en œuvre de toutes les stratégies expérimentales et pharmacologiques

(analgésie et anesthésie) disponibles actuellement pour minimiser les possibles effets délétères pour ceux-ci, avec un respect particulier de la notion de points limites (critères d'interruption en cas de souffrance des animaux) (raffinement) ; (4) L'utilisation de systèmes simplifiés (neurones en cultures ou lignées cellulaires) ne peut reproduire cette évolution lente de la maladie. De plus les études fonctionnelles dans un circuit neuronal "intact" *ex vivo*, combinées à des expériences de comportement nécessitent de facto l'utilisation d'un modèle murin (remplacement). La souris est une espèce de choix pour les études sur le système nerveux central des Vertébrés. L'organisation du système nerveux central de cette espèce est assez proche de celle de l'homme, ce qui permet une extrapolation des résultats obtenus. Nous utilisons le modèle souris qui est l'espèce de rongeurs permettant d'obtenir aisément des animaux modifiés génétiquement.

11407 Chez l'Homme, la polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune et inflammatoire sévère qui résulte d'un dysfonctionnement du système immunitaire qui va alors réagir contre des constituants du soi. Dans le cas de la PR, le système immunitaire va cibler principalement certains constituants des articulations, entraînant une inflammation agressive de la membrane synoviale et la destruction progressive des tissus alentours. Cette pathologie chronique et handicapante est multifactorielle, c'est-à-dire qu'elle résulte d'une participation de facteurs génétiques (gènes de prédisposition à la maladie), d'un ensemble de facteurs environnementaux (tabac, agents infectieux), et d'une dérégulation du système immunitaire (inflammation chronique non contrôlée, production d'auto-anticorps). Du fait de cette forte complexité, il est très difficile de récapituler ou modéliser cette maladie dans un système de culture cellulaire et d'en comprendre les différents dérèglements.

Aujourd'hui de nombreux modèles animaux sont bien établis et permettent d'étudier l'initiation et la progression de l'inflammation des articulations, un symptôme typique de la PR. Un de ces modèles consiste à transférer (par injection) chez des souris receveuses un sérum contenant des auto-anticorps préformés. Comme chez l'Homme, ces auto-anticorps sont un facteur essentiel du développement de la maladie et ils sont impliqués dans les processus de destruction osseuse. Cette méthode de transfert d'un sérum arthritogène (= qui provoque une arthrite) est avantageuse car elle permet le développement d'une arthrite courte, transitoire, rapide et qui ne nécessite de prédisposition génétique chez les souris receveuses.

Ce protocole de transfert d'un sérum arthritogène permet d'étudier l'implication des auto-anticorps dans l'inflammation articulaire destructrice, d'identifier les facteurs (génétique, environnementaux ou immunitaires) capables de moduler les effets destructeurs (en les diminuant ou en les aggravants) et enfin de trouver des traitements pour limiter ces effets.

L'objectif de ce projet est de maintenir et de créer les lignées de souris qui sont nécessaires pour produire et isoler le sérum arthritogène, en observant au maximum la règle des « 3 R » :

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire a été estimé au minimum mais néanmoins suffisamment pour pouvoir maintenir les différentes colonies et permettre la production d'un sérum arthritogène nécessaire pour induire l'arthrite chez 6 lots de souris/an soit un total de 450 souris utilisées pour l'ensemble du projet.

Raffiner : Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale et des points limites spécifiques ont été déterminés pour éviter toute souffrance animale et justifier un arrêt de l'expérience en cours. Les souris sont maintenues en groupe de 2-3 par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement est enrichi à l'aide de copeaux dans les litières et de carrés de cellulose pour la construction des nids ; les souris ont accès *ad libitum* à la nourriture et à de l'eau.

Remplacement : Le modèle animal est nécessaire ici car il n'existe pas de modèle pour reproduire *in vitro* la production des auto-anticorps nécessaire au modèle d'arthrite induite.

11408 Dans un premier projet, nous avons mis en place une première preuve de l'efficacité de notre stratégie thérapeutique, visant à cibler des cellules cancéreuses, chez la Souris.

Pour cela, nous avons travaillé sur des animaux sains, dépourvus de tumeurs, et avons pu mettre en évidence une réaction du système immunitaire, lorsqu'il était exposé à un ensemble de traitements que notre partenaire industriel développe actuellement.

Nous proposons maintenant de poursuivre le développement de cette approche en traitant des animaux porteurs de tumeurs.

Pour cela, nous allons employer un modèle tumoral murin, et greffer des cellules tumorales sur des Souris par injection sous-cutanée.

Ensuite, nous allons injecter à trois reprises, au même site, les traitements actuellement en développement, avec différentes doses, ainsi que les contrôles permettant de valider les effets.

Nous mesurerons par la suite l'évolution du poids et la taille des tumeurs présentes sur les animaux. Ces données permettront de valider la capacité thérapeutique de nos traitements.

Nous appliquerons des points limites stricts, liés à l'état général des animaux, mais aussi au volume des tumeurs présentes.

Chaque groupe expérimental sera compris de 13 animaux. 5 animaux seront euthanasiés 20 jours après la greffe tumorale, pour mettre en évidence l'état immunitaire des animaux dans chaque condition.

8 animaux par groupe seront étudiés sur une plus grande durée, jusqu'à atteinte d'un point limite ou au 90ème jour suivant la greffe, donnant lieu à l'euthanasie.

Remplacement : nous ne disposons pas à l'heure actuelle d'alternative pour la validation de l'efficacité d'un traitement à stimuler le système immunitaire ou thérapeutique. Nous devons en effet étudier cet effet dans un système complet et compétent.

Réduction : les effectifs de 8 et de 5 animaux par groupe ont été mis en place suite aux études préalables et aux prérequis statistiques, permettant tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés d'obtenir une réponse statistiquement significative et exploitable. Nous prévoyons d'utiliser un total de 169 animaux au maximum. Cela comprend 13 groupes comprenant 13 animaux.

Raffinement : le modèle tumoral utilisé est décrit dans la littérature et les points limites et la durée de l'étude ont été mis en place en fonction de ces données. Par ailleurs, nous avons mis en place les points limites nécessaires, liés au volume des tumeurs portées par les animaux et à leur masse relative, à l'évolution probable de l'état de santé. Les animaux seront observés quotidiennement pour s'assurer que leur état de santé n'est pas détérioré, et pesés 3 fois par semaine. Les tumeurs seront aussi palpées (pour détecter leur présence précoce) puis mesurées trois fois par semaines.

11409 La mise sur le marché des sérums antidiptériques nécessite un contrôle de l'activité biologique selon les référentiels réglementaires en vigueur. Les protocoles expérimentaux appliqués et les spécifications relatives à la qualité de ces sérums sont décrits dans les monographies de la Pharmacopée européenne. Ces méthodes ont été validées par les laboratoires européens à partir d'essais collaboratifs pour éviter que chaque laboratoire ait à revalider les méthodes (souche d'animaux, nombre, administration, ...) ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale pour vérifier l'efficacité de ces sérums. L'efficacité des sérums fait intervenir différents acteurs du système immunitaire, cette réponse ne peut être étudiée sur cellules isolées.

Les cobayes sont hébergés dans des cages enrichies de tubes PVC leur servant de cachette. La nourriture et l'eau de boisson sont contrôlés et disponible *ad libitum*. Pour se conformer à la règle des 3Rs, le nombre d'animaux par dose de produit est réduit tout en permettant une interprétation non ambiguë des résultats. En ce qui le raffinement de la méthode, les animaux sont suivis quotidiennement et nous avons mis en place des points limites pour apprécier les signes de douleur (prostration, perte de poids). Le nombre d'animaux nécessaires pour la libération des lots de sérums est de 15 cobayes/ an (pour un produit vs un sérum de référence) après une phase de mise en place de la méthode. Au total, dans la mesure où le programme prévoit 2 produits /an, le nombre d'animaux sera de 150 cobayes sur 5 ans.

11410 Les maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose sont la première cause de mortalité dans le monde. Le rôle joué par les lipides dans l'inflammation associée à l'athérosclérose est une piste thérapeutique prometteuse. ELOVL5 est une enzyme de type élongase (synthèse d'acides gras de type eicosanoïdes). Elle joue un rôle clé dans le métabolisme des acides gras et des phospholipides. Le but du projet est d'étudier l'influence d'un déficit en ELOVL5 sur le développement de l'athérosclérose chez la souris. Nous nous intéresserons à l'impact d'une déficience complète en ELOVL5 ou à celle d'une déficiente restreinte aux cellules souches sanguines (CSS) (cellules précurseurs des cellules immunitaires qui jouent un rôle clé dans l'inflammation associée à l'athérosclérose). Le développement de l'athérosclérose sera étudié dans 2 modèles de souris génétiquement modifiées qui reproduisent les caractéristiques physiopathologiques de l'athérosclérose chez l'Homme : les souris déficientes pour le gène des récepteurs aux LDLs (souris LDLr KO) et celles déficientes pour le gène de l'apolipoprotéine E (souris ApoE KO). Elles seront nourries avec un régime enrichi en cholestérol (CS). Ces souris susceptibles à l'athérosclérose seront croisées avec des souris n'exprimant pas ELOVL5 (ELOVL5 KO) ou transplantées avec des CSS de ces souris ELOVL5 KO. La transplantation de CSS permet de générer des souris qui présentent une déficience en ELOVL5 uniquement dans les cellules sanguines et les cellules immunitaires. Cette approche permet donc d'étudier spécifiquement la fonction d'ELOVL5 dans les cellules sanguines/immunitaires. Nous utiliserons des souris LDLrKO et ApoE KO comme receveuse de CSS.

Remplacement. L'utilisation de modèles murins pour étudier l'athérosclérose est nécessaire car l'athérosclérose est un processus physiopathologique complexe ne pouvant pas être modélisé *in vitro*. Les fortes similarités entre la souris et l'homme permettent d'extrapoler les conclusions à la situation humaine. La souris est le seul modèle disponible pour étudier les conséquences d'une déficience en ELOVL5. Réduction. Le nombre d'animaux prévu est calculé sur la base d'études antérieures. Compte tenu de la variabilité interindividuelle et des effets biologiques observés après l'inactivation de gènes clés, des groupes de 10 animaux seront utilisés pour établir des différences dans la formation de lésions athéromateuses. Les expériences seront réalisées chez des souris mâles et femelles afin de tenir compte du dimorphisme sexuel. Raffinement. L'irradiation (irradiation des souris receveuses pour la transplantation de CSS) et les régimes alimentaires utilisés (régime riche en CS), conduisant à la formation de plaques d'athéromes sont indolores. Durant cette période de prise de la greffe, les animaux recevront une antibiothérapie (enrofloxacin) afin de limiter le risque infectieux. Les prises de sang rétro-orbitales seront réalisées sous anesthésie gazeuse de même que l'euthanasie des animaux. Les animaux seront surveillés de manière journalière. Si une perte de poids supérieure à 20% du poids corporel est observée sur une période de 2 jours, les animaux seront euthanasiés après anesthésie. Ce type d'évènements est extrêmement rare. Nous ne pourrions pas administrer de traitement antalgique afin de ne pas interférer avec notre expérience qui repose sur l'étude de l'inflammation. 352 souris seront utilisées sur 5 ans.

11411 Les cellules immunitaires Natural Killer (NK) appartiennent à la première ligne de défense du corps contre les agents pathogènes. En effet, ces cellules sont capables de reconnaître et d'éliminer les cellules infectées par un virus mais également les cellules cancéreuses. Cependant, en cas de surstimulation, les cellules NK vont devenir tolérantes et ne pourront plus exercer leur fonction. Cette situation explique que de nombreuses tumeurs échappent au contrôle exercé par les cellules NK. Restaurer la fonction des NK et ainsi leur contrôle sur la tumeur, est donc un objectif de portée thérapeutique et constitue le but de notre projet. Il existe un modèle chez la souris permettant d'induire l'épuisement des cellules NK. Ce modèle a permis de démontrer que leur perte de fonction est accompagnée de l'expression de certains récepteurs suppresseurs apparaissant suite à la surstimulation par les cellules tumorales à la fois en contexte de tumeurs solides ou hématologiques chez la souris. En effet, les cellules NK dans ce contexte apparaissent comme suractivées mais perdent leur capacité à répondre par la suite. Notre objectif ici est de tester des immunothérapies potentielles afin de restaurer la fonctionnalité des cellules NK. Nous proposons de tester l'effet, sur les NK et sur la survie des souris, de thérapies bloquant les récepteurs suppresseurs ou bloquant une enzyme dont l'activité est très augmentée dans les cellules épuisées. Les souris seront injectées avec des cellules tumorales puis traitées avec les différents traitements et suivies durant

60 jours. Les cellules NK seront également isolées et nous testerons leur fonctionnalité. Ce type de projet nécessite l'utilisation de modèles animaux, le nombre d'acteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu étant trop nombreux et leurs interactions trop complexes pour pouvoir être modélisés *in vitro*. Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Ainsi, le nombre d'animaux nécessaires a été calculé de façon à apporter des réponses statistiquement fiables tout en évitant des euthanasies inutiles. Afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés (1500), des techniques de pointe permettant la mesure précise de l'activation des voies de signalisation dans les cellules (cytométrie en flux multiparamétrique, cytométrie d'image) seront utilisées. Par ailleurs, la douleur et l'angoisse causées aux animaux seront évaluées et réduites à chaque fois que cela sera possible. Nous avons défini des points limite au-delà desquels les animaux seront euthanasiés.

11412 L'autisme est une maladie du développement diagnostiquée en présence de deux types de symptômes : (1) une perturbation du comportement social et (2) des comportements répétitifs.

On ne connaît actuellement pas la cause de la maladie et il n'existe pas de traitement médicamenteux satisfaisant pour soulager les malades et leurs familles. Le projet que nous développons a pour objectif 1) de mieux comprendre l'origine de la maladie et 2) de proposer de nouveaux traitements.

Nous travaillons chez la souris, qui est un animal social : nous utilisons notamment des souris qui présentent des mutations génétiques ressemblant à celles des patients autistes. Nous testons chez ces animaux différents traitements afin de vérifier s'ils pourraient être proposés comme nouveaux médicaments pour soigner l'autisme.

Le projet de recherche que nous développons tient compte du bien-être animal en respectant le principe des 3R à savoir raffiner, réduire et remplacer.

Nous raffinerons nos expériences en prenant un soin particulier pour limiter les situations de souffrance ou d'inconfort des animaux tout au long du protocole expérimental. Par exemple, nous hébergeons nos animaux dans un environnement enrichi (maisonnette en carton, matériel de nidification) afin d'augmenter le bien-être des animaux. De plus nous avons défini des points limites pour l'ensemble de nos expériences pour limiter les situations de souffrance ou d'inconfort des animaux.

Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser nos expériences, nous nous attachons d'une part à utiliser les animaux des deux sexes (mâle et femelle) et d'autre part à tester chaque animal dans plusieurs paradigmes comportementaux afin de recueillir le plus d'informations possible pour chaque cohorte expérimentale. Enfin, l'utilisation d'outils statistiques puissants nous permet de réduire le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation des expériences.

Nous ne pouvons toutefois pas nous passer du modèle animal car l'autisme est une pathologie complexe qui ne peut être modélisée qu'au niveau de l'animal entier, exprimant toute la variété de son répertoire comportemental.

La mise en œuvre du projet de recherche nécessitera l'utilisation de 3380 souris sur 5 ans.

11413 Le diabète non insulino-dépendant de type 2 est un problème majeur de santé publique en raison de sa prévalence et du taux élevé de complications qu'il induit. Parmi ces complications, le défaut de cicatrisation représente une des causes majeures de morbidité et de mortalité des patients diabétiques. Les données de la littérature suggèrent que le retard de cicatrisation des personnes diabétiques résulterait de la chronicité de la phase inflammatoire. Cependant, les mécanismes impliqués sont encore méconnus.

Actuellement, peu de solutions thérapeutiques existent et aucune n'a encore permis d'apporter de solutions efficaces dans l'amélioration de la vitesse de cicatrisation chez le patient diabétique. La compréhension de la dérégulation des mécanismes cellulaires et moléculaires du processus cicatriciel chez le diabétique représente donc un enjeu essentiel pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Une approche pharmacologique visant notamment à moduler les fonctions des macrophages, cellules clés impliquées dans les mécanismes inflammatoires et

dans la cicatrisation, sera mise en place. Ce travail aura pour objectif d'identifier et de développer des stratégies pharmacologiques pertinentes dans le but de favoriser la cicatrisation chez le patient diabétique de type 2. Bien qu'une évaluation du potentiel thérapeutique de différentes molécules sera réalisée par des approches *in vitro* afin d'effectuer une pré-sélection des molécules d'intérêts, les modèles de cicatrisation expérimentaux murins utilisés dans ce travail et déjà décrits dans la littérature sont indispensables. Les modèles de souris utilisés seront des souris diabétiques sous régime gras ou génétiquement obèses. L'utilisation de souris génétiquement modifiées et invalidées pour des facteurs impliqués dans la polarisation des macrophages ou dans la production de médiateurs lipidiques nous permettra de comprendre et de mieux cibler les mécanismes de la résolution de l'inflammation. Un nombre maximum de 1134 souris sur 5 ans est envisagé. La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet. L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptés à l'expérience et aux potentiels effets indésirables des procédures sur l'état de santé global des animaux. Une surveillance journalière sera effectuée afin de suivre le poids mais aussi le comportement des animaux. La perte de poids (20% maximum), le changement de posture (recroquevillée, tremblement.), la modification d'activité (isolement, difficulté respiratoire) et l'aspect des poils sont des signes de douleurs qui seront des critères d'arrêt de l'étude. Nous procéderons alors à l'euthanasie des animaux afin de mettre fin à leur souffrance. Suite à la création de la lésion cutanée pratiquée sous anesthésie sur le dos des animaux, des biberons avec embouts longs, ainsi que des croquettes humidifiées permettront de faciliter l'hydratation et la prise de nourriture de ces souris. Ces aménagements permettront de limiter les déplacements et les redressements des animaux pour se nourrir.

Les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Ce projet a déjà obtenu l'accord du comité d'éthique régional antérieur. Les études effectuées nous ont permis d'optimiser l'utilisation de ces modèles murins, permettant de ce fait d'en réduire le nombre et de mieux appréhender les points limites pour le bien-être des animaux.

11414 L'insuffisance rénale chronique (IRC) est un problème de santé mondial touchant entre 10-15% de la population. Elle est caractérisée par une diminution du fonctionnement des reins, entraînant une accumulation de toxines sanguines à l'origine de nombreuses maladies du cœur et des vaisseaux telles que l'apparition d'une rigidité des artères due à des dépôts de calcium. Ces dernières représentent une des principales causes de mortalité chez les patients atteints d'IRC. La recherche de nouvelles cibles médicamenteuses devient donc un besoin urgent. Dans ce cadre, il a été observé que le sang des patients atteints d'IRC présente un taux anormalement élevé de certaines molécules qui pourraient se révéler être des cibles médicamenteuses d'avenir. Cependant, et avant d'en arriver à cette conclusion, il est au préalable nécessaire de valider cette hypothèse chez l'animal, ce que le présent projet de recherche se propose de réaliser.

Ainsi, ce projet utilisera des souris et comprendra des interventions chirurgicales afin de créer chez l'animal une IRC. A ce jour, aucun autre modèle n'est disponible pour permettre de reproduire les différents mécanismes impliqués dans cette pathologie justifiant le recours à l'animal dans ce projet. Une attention toute particulière au bien-être des animaux sera portée par l'application stricte de la règle des 3R dont l'objectif est de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la détresse et l'angoisse subis par les animaux.

Dans ce cadre, une procédure de prise en charge de la douleur (utilisation d'anesthésiant et d'antalgiques) sera mise en place avant, pendant et après les opérations chirurgicales afin de limiter la douleur et le stress et permettant une récupération optimale des animaux (utilisation de lampe et de table chauffantes, observation quotidienne des animaux, application d'un gel ophtalmique analgésique). Des points limites seront fixés et particulièrement observés au cours du projet permettant d'euthanasier les animaux dès leur apparition. Ils se manifestent par des signes de douleur tels que la prostration, un rythme cardiaque irrégulier, un isolement vis-à-vis de congénères, une mauvaise alimentation au travers de la surveillance de la prise de boisson et de nourriture.

Ce modèle d'étude animal ne peut par ailleurs pas être remplacé par un modèle *in vitro* car la validation finale de nouvelles cibles thérapeutiques nécessite d'utiliser un organisme dans son entier. En effet, l'approche sur cellules ne renseignerait pas sur l'ensemble des mécanismes

impliqués. De plus les approches informatiques ne permettent pas à ce jour d'avoir accès à la fonction d'un organisme. Le nombre d'animaux a, de plus, été réduit au maximum et les expérimentations ont été optimisées pour être regroupées chez le même animal dès que possible. Une étude statistique préalable permettant de déterminer le nombre d'animaux a été réalisée selon les recommandations liées au bien-être animal. Ce projet nécessitera sur toute sa durée (5 ans), 210 animaux répartis en 14 groupes de 15 souris (7 groupes subiront la chirurgie et 7 groupes serviront de témoin à cet acte). Les groupes recevront des molécules médicamenteuses différentes associées à leur contrôle. Enfin, les conditions d'hébergement incluront les mesures de raffinement adéquates afin de limiter le stress des animaux (enrichissement du milieu de vie, respect de la sociologie et de leur vie en groupe, surveillance quotidienne).

En conclusion, ce projet permettra de proposer à court terme de nouvelles cibles médicamenteuses afin de lutter contre le dépôt de calcium dans les vaisseaux entraînant leur rigidité au cours de l'IRC.

11415 Les infections virales et les co-infections virus/bactéries sont responsables d'un très grand nombre de décès tous les ans (17% des cas graves sur la période 2015/2016), il est pour cela nécessaire d'avoir à disposition de la recherche pharmaceutique des méthodes d'évaluation de nouveaux composés permettant le traitement de ces pathologies. Nous avons pour ambition de développer des modèles innovants permettant une évaluation plus rapide et plus prédictive des effets chez l'homme.

Dans l'approche des traitements des maladies infectieuses, le développement de modèles de pharmacologie *in vivo* demeure indispensable. Les tests *in vitro* à dispositions, effectués préalablement pour valider l'intérêt de la cible, ne permettent pas d'appréhender les mécanismes d'action de l'infection et les interactions hôtes/pathogènes.

Pour la réalisation des expériences, une plateforme a été créée. Elle propose un ensemble de prestations en pharmacologie *in vivo* : maladies infectieuses, inflammation et animaux transgéniques.

Les modèles utilisés et développés pour le projet sont des modèles souris.

Une attention toute particulière est portée sur le nombre d'animaux utilisés dans le projet. Nous travaillons avec une compagnie spécialisée dans les biostatistiques. Cette collaboration nous permet d'utiliser le nombre strictement nécessaire pour chaque expérience et de l'optimiser durant toute la durée du projet.

Le nombre calculé de souris utilisées est de maximum : 3750 soit 750/an.

Une veille scientifique est mise en œuvre pour étudier toute méthode scientifique alternative à l'expérimentation animale dans le domaine. Pour les protocoles où la douleur ne peut pas être prise en charge par des analgésiques, une observation accrue et des critères d'arrêt plus stricts seront mis en place (surveillance journalière, suivi du poids des animaux,.)

11416 Les maladies rénales chroniques ou aiguës sont un problème grandissant de santé publique dans nos sociétés. Les mammifères peuvent partiellement réparer leurs néphrons, l'unité fonctionnelle du rein, mais ne peuvent pas en former de nouveaux. Cette propriété existe par contre chez les requins : ils sont capables de former des néphrons de novo après une lésion dans le tissu rénal. Ces animaux constituent donc un modèle pour comprendre comment la régénération rénale pourrait être thérapeutiquement activée chez les mammifères.

Le présent projet vise à étudier les progéniteurs rénaux (sorte de cellules souches) chez les requins afin d'identifier les propriétés spécifiques qui leur permettent de se maintenir à l'âge adulte. Plusieurs travaux ont montré qu'il existait une corrélation inverse entre le taux de synthèse protéique et le vieillissement des cellules et des organismes. Nous envisageons donc de mesurer cette synthèse protéique dans les progéniteurs rénaux de requin. Le rythme de division de ces progéniteurs sera également analysé.

Etudier le comportement des cellules dans leur contexte, c'est à dire dans le tissu, est fondamental. En effet les interactions avec les cellules ou les molécules voisines apportent bien souvent des signaux qui sont nécessaires pour maintenir leurs propriétés. Connaissant cela, l'approche dans

l'animal entier est incontournable et explique que le présent projet ait recours à l'expérimentation animale.

L'espèce de requin que nous utiliserons dans cette étude est la petite roussette *Scyliorhinus canicula*, une espèce dont le statut de conservation est défini comme préoccupation mineure par l'union internationale pour la conservation de la nature (UICN). Il s'agit par ailleurs d'une espèce qui est couramment consommée en France et vendue sous le terme de saumonette. La petite roussette est une espèce ovipare ; la femelle peut pondre jusqu'à 100 œufs par an. Les quelques dizaines de femelles recueillies après la période de reproduction et stabulées dans l'établissement utilisateur permettent donc de s'assurer d'un nombre important d'individus. L'embryogenèse dure entre 5 et 6 mois, terme après lequel le juvénile sort naturellement de la coque et se retrouve sous forme libre dans l'eau de mer. La forme juvénile mesure environ 10 cm.

Les expériences sur les animaux juvéniles qui seront réalisées dans ce projet ne généreront pas une douleur supérieure à celle de l'introduction d'une aiguille. En effet, autant l'analyse du rythme de division que de la synthèse protéique dans les progéniteurs va nécessiter l'injection intrapéritonéale d'une solution contenant un analogue de la thymidine sur les animaux anesthésiés. L'analyse se fera ensuite sur le tissu rénal fixé dans une solution de paraformaldéhyde. Cette étape permet la préservation du tissu et donc son analyse ultérieure. Des points limites sont définies et contrôlés pour éviter toute souffrance potentielle.

Le nombre d'animaux utilisé dans les deux procédures expérimentales est fixé à 90 (réduction). Ce nombre nous permettra toutefois de réaliser les expériences deux fois avec un n suffisamment élevé afin de s'assurer un bon niveau de reproductibilité. Par ailleurs, un seul animal va permettre de générer plusieurs coupes histologiques sur lesquelles pourront être réalisées les analyses moléculaires (en relation avec la synthèse protéique et le rythme de division comme indiqué ci-dessus). Ainsi, bien que nous ayons plusieurs analyses moléculaires à réaliser un seul et même animal permettra de le faire (raffinement). Ces aspects sont en conformité avec deux des exigences de la règle des 3R reprise dans la directive européenne 2010 régissant l'expérimentation animale : réduction et raffinement. L'exigence de remplacement ne peut en outre être retenue. En effet, cette étude nécessite l'animal entier et, plus précisément, cette espèce puisqu'elle possède la propriété de régénération rénale.

Nous mènerons donc l'étude dans un premier temps sur les animaux juvéniles, faciles à obtenir et à maintenir lors des expérimentations. En effet, comme indiqué ci-dessus, une seule femelle peut pondre jusqu'à 100 œufs par an. Plusieurs femelles sont stabulées dans l'établissement utilisateur ce qui nous permettrait d'avoir recours à plusieurs centaines d'œufs pour ce projet. Nous choisissons cependant de fixer à 90 le nombre d'animaux que nous utiliserons. L'approche sur les juvéniles plutôt que sur les adultes dans un premier temps constitue également un choix stratégique. Les formes juvéniles sont plus nombreuses, plus faciles à manipuler et à maintenir et permettront d'obtenir des résultats rapides sur les propriétés des progéniteurs rénaux de requins. Cette stratégie permettra donc de limiter les coûts en infrastructure.

11417 Le carcinome ovarien se caractérise par des symptômes discrets et peu spécifiques, il est associé à la plus forte mortalité en pathologie gynécologique en conséquence du stade déjà avancé de la maladie lors du diagnostic.

La mise en place de résistance aux drogues ainsi que l'apparition de récives sous-entend un pronostic à long terme généralement non favorable. Cependant une réponse initiale à la chirurgie et la chimiothérapie est généralement observée.

Il existe donc un réel besoin d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques permettant de prolonger la durée de survie et contrecarrant les différentes résistances qui s'établissent.

Afin d'étudier la biologie de la tumeur face à des nouveaux traitements, les greffes de tumeurs humaines chez la souris représentent un excellent modèle permettant l'évaluation de nouvelles molécules.

Ce modèle d'étude permettra d'évaluer le potentiel anti-tumoral d'un peptide qui a déjà fait état de fortes propriétés anti-angiogéniques (détruisant la vascularisation de la tumeur) dans des modèles *in vitro* et *ex vivo*.

Le candidat médicament en question cible une protéine surexprimée au niveau de la tumeur, limitant ainsi les effets secondaires d'un tel traitement.

L'éventuel effet anti-tumoral du peptide sera testé dans un modèle de xénogreffe sous-cutanée en considérant l'inoculation de cellules cancéreuses ovariennes humaines (A2780 et SKOV-3) chez la souris athymique (immunodéficiente).

Le nombre d'animaux choisis pour ces procédures est toujours le nombre minimal nécessaire pour obtenir des résultats fiables et statistiquement significatifs. Un nombre maximal de 20 souris par lot sera considéré pour un effectif de 120 souris, y compris pour les contrôles en présence d'un peptide supposé inactif ou du solvant des peptides seuls, en ne considérant par souci de reproductibilité que des souris femelles âgées de 8 semaines – une étude préliminaire comprenant 4 souris par groupe et par type cellulaire (24 souris), permettra de déterminer le nombre d'animaux nécessaires afin d'obtenir un résultat statistiquement significatif. L'effectif total maximal sera donc de 144 souris.

Les propriétés anti-angiogéniques du peptide d'intérêt ayant déjà été largement démontrées dans les modèles *in vitro* et *ex vivo*, et le rationnel scientifique lié à la cible moléculaire étant par ailleurs particulièrement bien décrit dans la littérature, ces expérimentations complémentaires constituent un prérequis indispensable afin de consolider la preuve de concept de l'efficacité du peptide avant d'envisager son utilisation dans le cadre d'essais cliniques.

Durant toute la durée du protocole, les animaux seront hébergés dans des cages stériles enrichies (couvercle filtrant et change sous Poste de Sécurité Microbiologique) de 29,4cm L x 17,8cm l x 12,7cm H à raison de 5 souris par cage au maximum. L'eau et la nourriture seront mis à disposition *ad libitum* et la litière changée régulièrement. Un suivi quotidien des animaux sera assuré afin de limiter toute souffrance. Ainsi, toute modification du comportement (isolement, anxiété, ataxie) sera une indication pour l'euthanasie des animaux. Il en est de même pour toute perte importante de masse corporelle (15% de la masse des animaux) ou lorsque la tumeur atteint un volume critique de 1 cm³. En cas d'ulcération légère de la tumeur qui se produit parfois consécutivement à une nécrose importante sous l'effet d'un agent anti-angiogénique, application de bétadine et suivi plus régulier (toutes les 8h) si aggravation une euthanasie de l'animal est préconisé.

11418 Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant l'exploration du système gastro-intestinal par l'intermédiaire de tests validés. Il permet d'écarter des molécules qui auraient des effets néfastes sur la santé humaine, ou de garder des molécules qui pourraient faire preuve d'efficacité dans certaines pathologies.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et est mis en œuvre au sein du laboratoire de pharmacologie générale. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs, de chiens ou de furets et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. Il est en effet difficile, voire impossible, de remplacer la complexité des régulations physiologiques observées chez l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. L'utilisation d'animaux vivants, y compris de chien, est donc justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur le tractus gastro-intestinal.

Particulièrement impliqué dans l'usage raisonné des animaux de laboratoire et à fortiori de l'utilisation de chiens, nous mettons tout en œuvre pour réduire leur utilisation au strict nécessaire. Aussi, le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, les animaux sont réutilisés dans d'autres études afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Ces réutilisations sont soumises à l'avis du vétérinaire.

Le raffinement des méthodes expérimentales afin de réduire au maximum la souffrance animale est mis en œuvre grâce à l'utilisation de points limites clairement établis (incluant une surveillance de

l'aspect général, un suivi de poids...), permettant d'euthanasier tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse. Le programme d'anesthésie et d'analgésie est défini par un vétérinaire, afin de réduire au maximum toute douleur ou sensation de souffrance. De la même manière, lorsque les protocoles l'exigent, les chirurgies sont raffinées au maximum, en mettant à disposition des animaux, de l'oxygène à concentration ajustable, des tapis chauffants et de soins post-opératoires complets.

Aussi, les animaux sont manipulés fréquemment, les chiens sont sociabilisés 3 fois par semaines et il est mis en place un enrichissement complet dans leur hébergement, sous la forme de jouets, litière, objet de nidification, objet à ronger ou mastiquer, présence de congénère.

Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs, chiens ou furets qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 12400 (11000 rongeurs, 400 chiens et 1000 furets).

11419 Nous nous intéressons à la réponse immunitaire dirigée contre le cytomégalo virus (CMV), un herpès virus qui infecte une grande partie de la population humaine dès le plus jeune âge, le plus souvent de manière asymptomatique. En transplantation d'organe solide ou de moelle osseuse, du fait de l'immunodépression induite, l'infection à CMV peut entraîner des atteintes organiques sévères.

Notre projet découle d'une observation faite par notre équipe de recherche il y a plusieurs années : les patients transplantés infectés par le CMV présentent une augmentation dans le sang de cellules immunitaires particulières : les lymphocytes T gamma delta (LTgd). *In vitro*, ces LTgd reconnaissent et tuent des cellules infectées par le CMV et des cellules cancéreuses. Ces résultats suggèrent un rôle protecteur antiviral et anti-tumoral des LTgd induits dans le contexte de l'infection à CMV. Cette hypothèse intéressante est difficile à prouver chez l'homme. Notre but est donc de compléter ces données en utilisant le modèle murin de l'infection à CMV connu pour sa pertinence. Nous disposons en outre de souris déficientes pour des composants importants du système immunitaire nous permettant d'appréhender leur implication dans ce contexte. Nous avons ainsi pu prouver le rôle protecteur des LTgd contre le CMV, puisque des souris sans LT meurent de l'infection avec des atteintes organiques (poumons, foie), alors qu'en présence des LTgd les souris guérissent. Nous souhaitons continuer ce projet pour éclaircir le rôle des LTgd dans l'infection à CMV. Nous souhaitons également mieux appréhender le rôle de ces cellules dans le contrôle du développement de cancers.

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences 1880 animaux sur 5 ans. Dans le respect de la règle des 3R, nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. De plus, afin de réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons tous les mâles et toutes les femelles issus des croisements. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leurs naissances à leurs morts avec la définition de points limites pour éviter toute souffrance potentielle. Les animaux sont produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R.

11420 Notre projet consiste à étudier le devenir d'un biomatériau cellularisé in-vivo. Notre biomatériau est constitué d'un hydrogel naturel de fibrine qui permet de créer un environnement 3D pour les cellules stromales mésenchymateuses issues du tissu adipeux. Ce biomatériau cellularisé est étudié pour ses propriétés de cicatrisation/régénération de différents tissus, notamment dans des pathologies encore difficilement prises en charge par les thérapeutiques actuelles : les parodontites. Dans l'optique d'un essai clinique de régénération du parodonte chez l'Homme (ensemble des tissus de soutien des dents), il est indispensable de comprendre le devenir de ce biomatériau cellularisé in-vivo, d'estimer les effets bénéfiques aussi bien que de recueillir des données de sécurité concernant sa tolérance. Le but de ce projet est donc d'étudier l'évolution du biomatériau (dégradation ou maintien au cours du temps, colonisation par les cellules de l'hôte, réaction immunitaire,..) ainsi que l'évolution des cellules implantées (survie, prolifération, mort cellulaire...).

Le biomatériau avec ou sans cellules a déjà été étudié in-vitro générant un maximum de données pertinentes pour la clinique. Cependant, aucun modèle in-vitro n'existe pour étudier la réponse

immunitaire de l'hôte, les signaux systémiques, le recrutement/migration des différents types cellulaires après greffe de ce biomatériau cellularisé. Un organisme entier est donc indispensable : il n'y a pas de remplacement possible du modèle animal.

Afin de faire une étude approfondie du biomatériau et des cellules d'intérêt, nous utiliserons des souris immunocompétentes (pour estimer les effets systémiques et immunitaires avec un biomatériau murin) et des souris immunodéprimées (pour tester des biomatériaux xénogéniques).

Pour réaliser ce projet, nous envisageons donc de travailler sur 2 souches de souris. L'étude, en 5 temps différents, intégrera 1 groupe d'animaux greffés avec le biomatériau cellularisé et 1 groupe contrôle d'animaux greffés avec le biomatériau sans cellules. Nous analyserons le devenir des biomatériaux selon 2 modalités d'exploration différentes. Une même souris sera utilisée à la fois pour l'étude du biomatériau implanté ainsi que pour l'étude de la biodistribution des cellules greffées au niveau de l'organisme entier. Ainsi le nombre de souris est réduit à son minimum nécessaire sans compromettre les objectifs du projet et permettant un traitement statistique optimal des données récoltées.

Le nombre de souris utilisées dans ce projet sera de 810.

Nous apporterons une attention particulière au raffinement et respect du bien-être animal. En effet, à la réception les animaux seront acclimatés à leur nouvel environnement, puis seront hébergés au nombre de 4-5/cages permettant le respect du caractère grégaire de la souris. Nous proposons également d'enrichir l'environnement des souris, notamment avec du coton, favorisant la nidification et le bien-être animal. De plus, la surveillance des souris sera quotidienne et permettra ainsi de repérer et d'atténuer toute forme de douleur ou de souffrance pour l'animal.

La règle des 3R est respectée :

- Remplacement du modèle animal jusqu'à présent par des modèles d'étude *in vitro*. Un organisme entier est indispensable pour étudier la réponse immunitaire de l'hôte et le recrutement des différents types cellulaires (cellules immunitaires, vascularisation) au niveau du greffon ; ainsi que la migration (biodistribution) des cellules implantées dans l'organisme entier.
- Réduction du nombre d'animaux à son minimum (utilisation d'un seul groupe contrôle quand cela est possible, nombre de souris minimum mais suffisant pour les analyses statistiques)
- Raffinement par une attention particulière aux souffrances de l'animal et à son bien-être (observations quotidiennes, administration d'antalgique si besoin, anesthésie gazeuse, hébergement amélioré par de l'enrichissement...)

Les points limites sont établis par l'observation quotidienne des animaux : perte de poids rapide (10% en 24 ou 48h), ulcération/infection à l'emplacement de la greffe, si l'animal ne fait plus sa toilette ou s'il n'interagit plus avec ses congénères. Si un de ces points limites est observé, l'arrêt de l'expérimentation sera réalisé.

11421 Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des maladies touchant la moelle osseuse et sont responsables d'un manque de cellules du sang. Elles peuvent évoluer et se transformer en leucémie aiguë myéloïde. Le manque de globules rouges (anémie) représente la complication majeure des SMD et nécessitent alors des transfusions de poches de sang. Les patients atteints de syndromes myélodysplasiques et transfusés régulièrement ont une survie altérée. Nous pensons que les vésicules extracellulaires présentes dans les poches de transfusion de sang pourraient influencer l'évolution de la maladie vers la leucémie aiguë. Ces vésicules permettent l'échange de molécules actives et pourraient réguler l'expression de gènes impliqués dans le processus d'évolution vers la leucémie. Nous proposons d'évaluer l'effet des vésicules extracellulaires *in vivo* sur l'hématopoïèse des patients atteints de myélodysplasies, dans un modèle de souris injectées avec des cellules de la moelle osseuse humaine qui vont donner naissance aux cellules du sang humain dans la souris. Cependant, à notre connaissance, il n'a pas été démontré que ces vésicules provenant des poches de transfusion de sang pouvaient spécifiquement cibler la moelle osseuse. C'est ce que nous proposons de réaliser en marquant ces vésicules avec un composé fluorescent et de suivre l'évolution de cette fluorescence au cours du temps avec visualisation de la circulation des vésicules au sein de l'animal. Il est impossible, à l'heure actuelle, de reproduire de manière *in vitro* une

hématopoïèse avec tous ses composants pour étudier la biodistribution des vésicules extracellulaires provenant des poches de transfusion de sang après injection dans la circulation sanguine. Par ailleurs, aucun modèle mathématique ou informatique ne permet actuellement d'évaluer également cette biodistribution. L'ensemble de ces procédures pouvant s'accompagner d'une douleur/angoisse modérée, tous les efforts seront entrepris pour réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ressentie par les animaux. C'est pourquoi nous surveillerons l'état de santé des animaux tout au long des expériences afin de pouvoir intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de douleur, de souffrance ou d'angoisse. Les injections au des vésicules au niveau de la veine de la queue de même que les procédure d'imagerie se feront sous anesthésie gazeuse (isoflurane : 4% pour l'induction et 1.5% pour le maintien). De plus, le nombre d'animaux nécessaire à cette étude a été réduit au minimum sur la base des besoins imposés par la reproductibilité des observations scientifiques. De fait, un nombre total de 8 souris sera nécessaire. Cette étude nous permettra d'analyser la biodistribution des vésicules extracellulaires provenant des poches de transfusion de sang et en cas de localisation au niveau de la moelle osseuse de déboucher sur de nouvelles hypothèses physiopathologiques expliquant le taux plus important d'évolution en leucémie aigüe des patients myélodysplasiques soumis à de nombreuses transfusions sanguines.

11422 Le cancer du pancréas représente un problème de santé publique en occupant le deuxième rang des cancers digestifs en France. Ce cancer est très souvent diagnostiqué à un stade avancé avec un nombre de cas en constante augmentation. Il devrait être la deuxième cause de mortalité par cancer en Europe en 2030. Le traitement du cancer est adapté au patient (âge, antécédents médicaux, état de santé et profil de la tumeur). Potentiellement, la chirurgie est le seul traitement curatif du cancer, si celui-ci est diagnostiqué à un stade précoce. Sinon, la chimiothérapie avec ou sans la radiothérapie est recommandée. Différents types de chimiothérapie sont alors considérées, elles peuvent être associées (par exemple, la Gemcitabine ou le Nab-Placlitaxel). L'acquisition de la résistance à la chimiothérapie est la cause la plus classique d'une rechute après traitement. Nous avons montré, par des études sur des cellules en culture que l'orexine-A, la molécule que nous étudions, produite normalement par le cerveau chez l'Homme, provoque la mort cellulaire des cellules cancéreuses. Le but de notre projet sera de montrer que nos résultats sont retrouvés sur un modèle préclinique chez la souris nude présentant un système immunitaire affaibli. Notre étude visera à démontrer que 1) l'orexine-A inhibe la croissance tumorale de tumeurs implantées en sous cutanée chez ces souris et 2) le traitement combiné de l'orexine-A avec les chimiothérapies Gemcitabine ou Nab-paclitaxel améliore les effets des traitements classiques sur la croissance des tumeurs chez l'animal. Ce projet se déroulera sur une période de 3 ans dans des locaux agréés et nécessitera un nombre total de 90 animaux. La conformité avec les exigences de remplacement, réduction, et raffinement seront pris en compte : 1) remplacement : les connaissances issues de cette étude sur l'animal ne peuvent pas être obtenues actuellement par d'autres méthodes compte-tenu de la complexité physiologique de l'architecture de la tumeur comprenant plusieurs types cellulaires (tumoral, de nature stromale et immunitaire) impossible à reproduire sur des lignées cellulaires, nous obligeant de travailler à l'échelle d'un organisme. Des études sur cellules en culture sont, par ailleurs, prévues pour étudier d'autres paramètres et qui complèteront ce volet d'expérimentation animale sans pouvoir le remplacer ; 2) réduction : nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant dans chaque sous-groupe pour avoir des résultats statistiquement exploitables (5 par sous-groupe) et 3) raffinement : les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Une anesthésie sera effectuée lors des procédures douloureuses pour l'animal (comme l'implantation en sous-cutané par injection des cellules tumorales) et l'utilisation d'antalgiques sera envisagée si l'animal présente des signes de douleur au cours de l'expérimentation (croissance tumorale). La procédure d'injection de l'orexine-A et/ou des 2 molécules chimiothérapiques aux souris n'induit aucune souffrance manifeste des animaux et sera effectuée par injection en intrapéritonéal sur animal vigile. Un suivi clinique et une surveillance des animaux (pesée, évaluation de l'état général, mesure des tumeurs sous-cutanées implantées) seront effectués 3 fois par semaine tout au long de la procédure qui durera au maximum 40 jours selon la vitesse de croissance des tumeurs. Aucun prélèvement

ne sera fait durant toute la durée de la procédure avant l'euthanasie de l'animal. En cas d'atteinte de point-limite, de dépassement de la taille limite des tumeurs (> 1500 mm³, correspondant à une masse ≥ 5% du poids de la souris) ou de souffrance par l'animal (perte de poids au-delà de 20% par rapport au groupe contrôle, prostration et arrêt de toilettage, aspect de la peau) celui-ci sera euthanasié immédiatement. Avant prélèvement des tumeurs à analyser, l'euthanasie des animaux sera toujours faite par anesthésie gazeuse suivie de dislocation cervicale. Au cours de la procédure, nous suivront un groupe non traité mais implanté avec les tumeurs qui constituera le groupe contrôle qui étant implanté sera sacrifié également à la fin de l'expérience.

11423 L'association benzylpénicilline/dihydrostreptomycine est utilisée chez les bovins, les porcs, les chiens et les chats pour traiter des infections généralisées chez le jeune et l'adulte, des pneumonies ou pleuropneumonies, des infections postpartum, des infections urinaires, des plaies infectées, des abcès ou des infections postopératoires due à des organismes pathogènes sensibles à la benzylpénicilline et à la dihydrostreptomycine.

Nous souhaitons déterminer à terme l'efficacité de la benzylpénicilline et de la dihydrostreptomycine pour traiter des infections urinaires chez la truie et s'il serait nécessaire ou non de revoir les posologies utilisées actuellement en élevage.

Cependant, il n'y a pas de données récentes sur la pharmacocinétique de la benzylpénicilline et de la dihydrostreptomycine chez le porc. Il est donc nécessaire, avant de déterminer l'efficacité de ces deux antibiotiques, de déterminer d'abord l'évolution des concentrations plasmatiques et urinaires de benzylpénicilline et de dihydrostreptomycine.

Pour cela, 8 porcs seront utilisés. Ils recevront une administration intramusculaire de l'association benzylpénicilline/dihydrostreptomycine à la dose classiquement utilisée en élevage. Des prises de sang seront réalisées le jour de l'administration et pendant les 7 jours suivant. Les porcs seront placés en cage à métabolisme afin de récupérer les urines en parallèle. Le taux d'élimination de la molécule dans les urines ne sera calculé que sur 5 jours afin de ne pas laisser les porcs sans sortir des cages à métabolisme plus de 5 jours. Du 6^{ème} au 8^{ème} jour après administration, ils ne seront placés dans les cages que 2h le matin afin d'avoir tout de même des données sur les concentrations urinaires à comparer aux concentrations plasmatiques.

Aucune étude statistique n'est prévue, les porcs appartenant tous au même groupe. Le nombre de 8 porcs a été déterminé en prenant en compte la variabilité interindividuelle potentielle des concentrations plasmatiques et urinaires. Deux porcs satellites seront ajoutés au projet afin d'obtenir du plasma et des urines sans antibiotique pour réaliser les gammes servant au dosage des molécules et des contenus intestinaux sans antibiotique pour un autre projet. Un total de 10 porcs seront donc utilisés pour l'ensemble du projet.

Il n'est pas possible de se passer d'animaux pour ce projet car le devenir d'un médicament dans un organisme (pharmacocinétique) n'est pas prévisible par des études *in vitro* compte-tenu de la complexité des mécanismes (mécanismes d'absorption, métabolisme hépatique, diffusion tissulaire, élimination rénale...) mis en jeu. Cependant, les études d'efficacité réalisées dans le futur et s'appuyant sur les résultats de ce projet pourront être menées *in vitro*.

Jusqu'au placement en cages à métabolisme, les porcs seront hébergés en groupe avec des ballons et des balles à mâcher à disposition. Les balles à mâcher pourront ensuite être accrochées dans les cages à métabolisme. Pour limiter leur stress lors des prises de sang, ils seront entraînés à la manipulation avant la réalisation du projet et du sirop de cassis leur sera donné comme "récompense" pour faciliter leur acceptation/apprentissage des manipulations. En cas de réaction allergique au traitement, une administration de corticoïdes sera réalisée et l'animal sera exclu de l'étude. Il pourra être remplacé par l'un des deux satellites. Si un hématome se forme lors des prises de sang à la jugulaire, la veine ne sera plus prélevée jusqu'à résorption de l'hématome et on utilisera l'autre veine jugulaire. Des poches de glace préalablement réfrigérées permettront également de réduire la douleur en cas d'hématome. A la fin de l'étude, les 8 animaux ayant reçu les deux antibiotiques ne pourront pas être conservés pour une autre étude car leur poids à la fin du projet

ne permettrait pas de les héberger dans des conditions acceptables pour un autre projet (manque de surface au sol dans les box). Ils pourront cependant être placés.

11424 Le système immunitaire permet à l'organisme de combattre les infections en deux vagues successives. L'immunité innée rapide reconnaît le pathogène comme étranger. La seconde vague, dite adaptative, est plus lente à se mettre en place, mais peut garder en mémoire cette première infection (base de la vaccination). L'immunité adaptative a longtemps été considérée comme la seule ayant des capacités de mémoire, mais nos études montrent maintenant que l'immunité innée possède aussi un type de mémoire : après une première infection (par le champignon *Candida albicans*), les cellules innées sont plus efficaces face à une seconde infection avec plusieurs types de pathogènes (champignons, bactéries.). C'est le 'training de l'immunité innée'. Ces découvertes effectuées principalement *in vitro* sur des cultures de cellules humaines primaires n'expliquent toutefois pas complètement les mécanismes mis en jeu lors de la protection observée *in vivo* chez les mammifères, et plusieurs points capitaux restent à éclaircir.

Nous savons que *Candida albicans*, ou le fragment de sa paroi cellulaire appelé β -glucan, protège les souris contre une deuxième infection à *Candida albicans* mais aussi contre une infection bactérienne à *Staphylococcus aureus*. Les cellules responsables doivent donc être présentes à différents points stratégiques qui sont inconnus. Nous savons que les cellules de l'immunité adaptative ne sont pas nécessaires, mais que les phagocytes de l'immunité innée sont importants. Or ces phagocytes ont une durée de vie courte bien que la protection dure relativement longtemps. Nous proposons donc quatre procédures pour répondre aux trois questions scientifiques suivantes :

1er objectif : savoir combien de temps peut durer la protection (contre des infections) induite grâce au 'training de l'immunité innée' par *C. albicans*/ β -glucan, puis identifier les cellules immunitaires et mécanismes responsables de la protection (procédures n°1 et 2, sévérité modérée).

2ème objectif : étudier les effets du β -glucan sur différentes populations cellulaires matures dans différents organes/tissus et sur les progéniteurs dans la moelle osseuse, afin de comprendre comment le β -glucan peut protéger contre tant d'infections différentes (procédure n°3, sévérité légère).

3ème objectif : établir si les effets du training au β -glucan sur la moelle osseuse (réservoir et source de cellules immunitaires sanguines) et sur les macrophages (cellules qui résident dans les tissus tout au long de la vie) sont responsables de la protection contre les infections ensuite (procédure n°4, sévérité modérée).

Le bénéfice attendu de ce projet est une meilleure compréhension de la biologie de la mémoire de l'immunité innée, en déterminant sa durée et les cellules impliquées : deux aspects essentiels pour pouvoir envisager des traitements basés sur la mémoire de l'immunité innée.

Le projet concerne la protection contre des infections aux champignons (*C. albicans*) et aux bactéries (*S. aureus* et *Escherichia coli*). Les seuls dommages attendus sont pour les animaux « contrôles » non-protégés et liés aux doses infectieuses de microorganismes utilisées pour simuler les infections. Des points limites sont définis pour chaque procédure expérimentale afin de réduire ces dommages.

Les expérimentations seront effectuées dans le respect du principe des trois R :

Remplacement : les mécanismes de mémoire de l'immunité innée ont déjà été étudiés *in vitro* avec des cultures de cellules humaines, Le recours à l'animal est indispensable pour comprendre les mécanismes qui entrent en jeu *in vivo* et mesurer l'effet de procédures d'entraînement du système immunitaire inné chez les mammifères qui possèdent un système immunitaire inné complexe. De plus, nous voulons mettre en évidence les acteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu lors d'infections systémiques, ce qui nécessite l'analyse d'un organisme complet, afin d'analyser différents organes d'un même individu.

Réduction : Nous utiliserons des souris femelles adultes dans la continuité des travaux similaires publiés pour ce type d'étude. Le nombre de souris nécessaires à ce projet est évalué à 9600 sur 5 ans. Ce nombre a été déterminé après consultation d'une biostatisticienne et analyses statistiques préalables permettant de déterminer à partir de combien de sujets une mesure est exploitable

scientifiquement, et ce dans le souci de n'utiliser que le strict nécessaire d'individus tout en récupérant le maximum d'informations par animal.

Raffinement : Le suivi des animaux selon une liste de signes cliniques permettra d'attribuer un score quantitatif de bien-être des animaux. Un enrichissement alimentaire sera mis en place au besoin. Si un animal atteint un point limite, il sera euthanasié afin de minimiser ses souffrances. Dans le cas spécifique de la durée de la protection induite par le training, des temps de plus en plus longs seront testés entre l'inoculum protecteur et l'inoculum infectieux. Dès que la protection sera perdue, les expériences incluant des temps encore plus longs seront annulées afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire à notre étude.

11425 Le programme de notre formation est établi à l'échelle nationale et comprend des enseignements pratiques de physiologie animale et de pharmacologie-toxicologie. Par ailleurs, durant leur cursus, nos étudiants suivent une formation qui qualifie le personnel appliquant des procédures expérimentales aux animaux (niveau II/A) (obtention après réussite à des examens théorique et pratique spécifiques).

Le projet décrit ici s'inscrit dans le cadre de l'étude des grandes fonctions et de leur régulation. L'effet de différents paramètres sur la fonction ventilatoire sera étudié. Ce travail s'effectuera en binôme (Réduction) sur des rats préalablement analgésiés et anesthésiés (Raffinement) qui seront réveillés en fin de manipulation et qui retourneront en animalerie. Afin de minimiser au maximum le nombre d'animaux utilisés, ce TP ne sera proposé qu'à certains étudiants tandis que d'autres étudieront des résultats expérimentaux bruts (en fonction des options). Cette réduction permet de rester cohérent avec le PPN (Programme Pédagogique National) et de minimiser le nombre d'animaux utilisés.

En conséquence sur une année scolaire, 32 rats, seront nécessaires pour ces 7 séances de TP en 1ère année pour l'encadrement de 144 étudiants (Réduire).

Sur 2 ans : 64 animaux utilisés pour la formation de 288 étudiants.

Les actes pratiqués étant de sévérité modérée les animaux utilisés ne seront pas euthanasiés et, sous réserve d'un rétablissement complet, ils subiront une 2ème anesthésie à 1 semaine d'intervalle avec un autre groupe d'étudiant. Cette séance remplace une séance de TP qui impliquait jusqu'alors une procédure sans réveil, pour la totalité de nos étudiants et sans possibilité d'une telle réutilisation.

11426 Deux aspects du comportement animal sont particulièrement impressionnants : la capacité d'apprentissage de nouveaux comportements et celle d'adapter ces comportements appris à des contextes changeants. Un exemple classique de cette double aptitude est celui de la conduite automobile qui nécessite un apprentissage initial puis une adaptation aux conditions de trafic qui sont, par nature, fluctuantes. L'apprentissage et l'adaptation requièrent des prises de décisions qui sont influencées par des informations immédiates sensorielles, par nos expériences passées et par notre état interne (motivation, attention, etc.). L'adaptation des prises de décisions en fonction du contexte définit la notion de couplage sensorimoteur. Il semble que des défaillances du couplage sensorimoteur contribuent aux déficits comportementaux observés dans la maladie de Parkinson mais aussi à des troubles "cognitifs" tels que ceux observés chez les autistes. La compréhension du couplage sensorimoteur reste parcellaire ce qui constitue un frein au développement de thérapies efficaces contre ces maladies.

L'hypothèse que nous voulons tester dans ce projet est que les ganglions de la base, un ensemble de régions sous corticales dont le dysfonctionnement est associé avec des troubles comportementaux importants (maladies de Parkinson, troubles attentionnels, compulsions.), jouent un rôle crucial dans ce couplage sensorimoteur en contrôlant l'intensité et le timing des réponses comportementales, en fonction du contexte sensoriel et de l'état interne. Tester cette hypothèse nécessite une approche expérimentale d'enregistrements et de perturbations de l'activité neuronale des ganglions de la base et de régions corticales (cortex moteur et somatosensoriel) sur l'animal qui est engagé dans des tests comportementaux dans lequel le timing des prises de décisions et la vitesse d'exécution des actions choisies peuvent être quantifiés. Le modèle rongeur (rat et souris)

est le plus adapté à notre objectif. Ces animaux sont capables d'apprendre des tests comportementaux avec prise de décision. De plus les ganglions de la base et l'organisation des connexions corticales sont très bien conservés chez les rongeurs. Le modèle rongeur est préféré au modèle primate non-humain pour des raisons de reproductibilité (facilité d'inclure un nombre important d'animaux qui contribuera à améliorer la robustesse statistique et gagner en reproductibilité) et de possibilités techniques (enregistrement et perturbation de types neuronaux par des techniques optogénétiques ou d'ablations cellulaires).

L'ensemble des expériences (tests comportementaux, effets des perturbations ciblées de l'activité cérébrale, enregistrements de l'activité neuronale dans des régions cérébrales ciblées lors des tests) présenté dans cette demande et l'analyse statistique des résultats permettront de mieux comprendre comment s'opère le couplage sensorimoteur et le rôle des ganglions de la base. Cette meilleure compréhension de la fonction des ganglions de la base est obligatoire pour réfléchir à de nouvelles stratégies thérapeutiques visant les maladies des ganglions de la base (Parkinson, Huntington, addictions, obsessions, impulsivité et hyperactivités) qui touchent une fraction significative de la population. Le nombre maximal d'animal prévu dans ce projet est de 670 (338 rats et 332 souris). Le remplacement de ces animaux par des approches *in vitro* n'est pas possible puisqu'il s'agit ici de comprendre les mécanismes qui sont directement dépendant de la performance comportementale. Le nombre d'animaux est significativement réduit grâce l'utilisation de grilles d'électrodes sur l'animal en comportement. Un grand nombre de neurones peut être enregistré par animal et des corrélations directes (donc statistiquement puissantes) peuvent être faites avec le comportement. Enfin tout est mis en œuvre pour réduire au minimum le stress (hébergement en groupe, habituation progressive aux protocoles comportementaux) et les douleurs post-opératoires (utilisation d'anti-inflammatoires et antalgiques, surveillance accrue des animaux).

11427 L'équipe s'intéresse au contrôle hormonal et/ou nutritionnel des sécrétions des cellules du tissu adipeux (adipokines) et leur implication dans les dérégulations métaboliques associées à l'obésité (résistance à l'insuline, diabète, certaines maladies rares, cancer). En plus du tissu adipeux, il est maintenant clairement établi que les tissus clefs impliqués dans le métabolisme énergétique comme les muscles squelettiques et le foie sécrètent aussi des molécules appelées respectivement myokines et hépatokines, capables d'agir de façon locale ou via la circulation sanguine. Nous avons par conséquent élargi nos études au rôle de ces différentes sécrétions ainsi qu'à leur mécanisme d'action dans différentes pathologies métaboliques (obésité, diabète de type 2,..). L'équipe a pu ainsi montrer qu'une adipokine essentiellement régulée par l'insuline, possède des propriétés anti-diabétiques dans un modèle de souris obèse et pré-diabétique. Un essai clinique récent chez l'Homme a pu également démontrer que l'administration aigue de cette molécule améliore la sensibilité à l'insuline. Cependant l'efficacité de cette molécule n'a pas été étudiée chez des souris présentant un état diabétique sévère, ni même la conservation des effets bénéfiques après l'arrêt du traitement. De plus, ces différentes sécrétions (adipokines, myokines..) sont peu caractérisées (expression tissulaire, concentrations sanguines, effets métaboliques..) en fonction du sexe.

Dans ce but, nous utiliserons un modèle génétique de diabète de type 2 : les souris db/db (déficientes pour le récepteur à la leptine) et un modèle de souris dont l'alimentation permet une surcharge énergétique (régimes riches en graisse et/ou en sucre) entraînant la mise en place d'une obésité et un état pré-diabétique. Pour chaque modèle des souris mâles et femelles seront étudiées. De manière à évaluer l'efficacité des différentes sécrétions, ces dernières peuvent être administrées par voie intra-péritonéale ou intra-veineuse. Divers paramètres physiologiques seront suivis de façon non invasive lors des expérimentations (prise de poids, mesure de la prise alimentaire/hydrique, pourcentage de masse grasse/maigre, comportement, activité physique...). Dans certains cas une prise de sang de petit volume permettra de suivre des index métaboliques (glycémie et taux d'insuline dans le sang lors de tests fonctionnels). Enfin suite à l'euthanasie une étude précise des paramètres sanguins mais également tissulaires sera effectuée.

Les différentes procédures proposées n'entraînant aucune douleur physique (y compris la mise en régime gras car les animaux sont euthanasiés avant que les désordres métaboliques provoqués n'engendrent une quelconque invalidité), elles seront réalisées sur les mêmes groupes d'animaux

dès lors que les animaux auront recouvré un bien-être général et dans la mesure où elles n'interfèrent pas entre elles (principe de réduction de la règle des 3Rs). Nous utiliserons les services d'une plateforme technologique spécialisée dans le phénotypage métabolique afin de bénéficier de l'expérience du personnel et d'appareils de pointe permettant l'acquisition de plusieurs types de données à la fois (limitation du nombre de manipulations des animaux et garantie d'une parfaite maîtrise de toutes les techniques = principe de raffinement de la règle des 3Rs). Compte tenu de la variabilité des paramètres biologiques généralement observée au sein d'un groupe et de la durée des protocoles, des groupes de 8 animaux seront constitués afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiques (principe de réduction de la règle des 3Rs). L'ensemble du projet nécessitera au maximum 1248 souris qui seront réparties sur différentes expérimentations : 5 molécules à tester au cours des cinq prochaines années.

Les procédures seront réalisées dans le respect du bien-être animal pour limiter la souffrance, la douleur ou l'anxiété des animaux (les souris seront hébergées par cages de 4, des carrés de ouate et des igloos seront placés dans les cages pour leur permettre de faire un nid) et en respectant des points limites préalablement définis (une perte de poids atteignant 20%, un comportement anormal grave - arrêt d'alimentation -, un isolement vis à vis du groupe de plus de 24 h conduiront à un arrêt d'urgence de l'expérimentation). L'observation quotidienne des animaux sera réalisée par du personnel qualifié de la zootechnie et de l'équipe de recherche.

11428 1. Objectif du projet

TLR3 est un récepteur de l'immunité innée, exprimé par des cellules immunitaires et épithéliales. Dans les cellules cancéreuses qui expriment toujours le récepteur (cancer du sein, poumon,..), l'activation du récepteur entraîne à la fois une inflammation mais aussi la mort de ces cellules cancéreuses. La possibilité de ciblage thérapeutique de TLR3 dans les cancers a été confirmée par une étude rétrospective démontrant que seules les patientes dont le cancer du sein exprimait TLR3 avaient répondu favorablement à un traitement avec un ligand de TLR3.

Malgré leur activité adjuvante en vaccination, aucune molécule cible de TLR3 n'a à ce jour obtenu l'autorisation de mise sur le marché, en raison d'effets toxiques ou de manque d'efficacité, et d'homogénéité structurelle.

Récemment, une famille de ligand de TLR3, parfaitement défini structurellement et donc reproductible a été mis en évidence. La preuve de concept *in vitro* de l'effet pro-apoptotique de ces molécules sur des cellules tumorales a été apporté *in vitro*. De façon très intéressante, les cellules traitées par le ligand de TLR3 présentent des marqueurs permettant de prédire une activation du système immunitaire.

Le but de ce projet est de prouver l'efficacité de ces ligands dans des modèles précliniques murins.

2. Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie.

Le projet a pour but d'identifier de nouveaux ligands anti tumoraux, ciblant les cancers épithéliaux TLR3. Ces résultats s'inscrivent dans le cadre du développement d'une application thérapeutique applicable chez les patients.

3. Conformité aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement.

Seul un modèle *in vivo* permettra d'étudier l'efficacité de ces ligands au cours des différentes étapes de la progression tumorale. De plus, les approches de déplétion par anticorps de cellules immunitaires ne sont pas possibles chez l'Homme. De ce fait la validation de TLR3 comme cible thérapeutique se verra d'abord testée chez la souris comme modèle préclinique avant de l'appliquer à l'Homme.

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée ; Réduction du nombre d'animaux sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Raffinement : Une définition précises des points limites et une surveillance adaptée des animaux minimum 2 fois par semaine, permettra d'éviter la souffrance des animaux. De plus, tous les gestes pouvant provoquer un stress ou de l'anxiété chez la souris, seront réalisés sous anesthésie. Ces procédures ne requièrent pas l'usage d'analgésique. Lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations sera récolté afin de

restreindre l'utilisation de l'animal. Remplacement : En effet, de nombreuses analyses *in vitro* seront réalisées sur les différents prélèvements pour documenter et obtenir le maximum d'informations sur ces modèles précliniques.

Seul un modèle *in vivo* nous permettra d'étudier l'effet de cette molécule sur la croissance de cellules tumorales.

4. Nombre total d'animaux inclus dans le projet

Le nombre de souris total pour les 3 procédures est : 560

11429 Chez les mammifères, le néocortex constitue une structure remarquablement plastique assurant leurs multiples capacités d'adaptation et d'apprentissage. Cette plasticité corticale serait assurée par le renforcement durable des connexions (synapses) entre neurones, appelé potentialisation à long-terme (LTP), mécanisme cellulaire majeur des mécanismes qui sous-tendent l'apprentissage et la mémoire par une augmentation de la force de communication entre les synapses. Malgré son rôle supposé critique dans le fonctionnement du cerveau (apprentissage, mémorisation) et de ses altérations, la relation entre la LTP *in vivo* et le comportement reste largement inconnu. Pour répondre à cette question essentielle, nous proposons de tester l'effet du blocage de la LTP dans la cortex somatosensoriel "en tonneaux" de souris vigiles au cours du comportement d'exploration. Le cortex sensoriel est constitué de neurones interconnectés et organisés en colonnes. Chaque colonne de neurones ne répond qu'à des stimulations appliquées sur une région précise du corps. Les neurones du cortex cérébral sont répartis en six couches superposées. Cette organisation permet d'amplifier les connexions entre les neurones. Chez les rongeurs, chaque vibrisse (« moustaches ») à sa propre aire de projection dans le cortex, un tonneau. La cartographie des tonneaux dans le cortex est déterminée par le positionnement anatomique des vibrisses correspondantes, et l'on peut facilement établir le lien entre l'ablation d'une vibrisse à la naissance et la disparition du tonneau correspondant. Cette modification du cortex somatosensoriel s'accompagne d'une réorganisation des tonneaux des vibrisses avoisinantes. Ceux-ci vont occuper l'espace laissé vacant, proportionnellement à leur utilisation, par compensation du déficit résultant de la non utilisation de la vibrisse disparue.

Nous bloquerons la LTP, en immobilisant une catégorie de récepteurs au glutamate, responsable de la transmission excitatrice entre les neurones (les récepteurs AMPA) avec des anticorps spécifiques qui seront appliqués au niveau du cortex par le biais de canules implantées par stéréotaxie.

Le cortex en tonneaux des rongeurs est donc devenu un modèle de choix dans l'étude de la plasticité corticale, qui permet le traitement de l'information tactile reçue par les vibrisses. Pour tester notre hypothèse, nous utiliserons un test comportemental ("gap crossing test") avant et après le blocage de la LTP. Les avantages de ce test sont multiples : 1) il est robuste 2) peu coûteux et simple à mettre en place ; et 3) est assuré exclusivement par le traitement des informations sensorielles issues des vibrisses par le cortex en tonneau. Ce projet nous permettra donc de mettre à jour pour la 1ère fois le lien entre la plasticité synaptique et le comportement, et donc de comprendre ses altérations qui peuvent intervenir chez l'Homme au cours de pathologies psychiatriques, qu'elles soient génétiques ou liées à l'âge.

Par définition, ces études ne peuvent être réalisées qu'*in vivo*, et leurs résultats pourront donc être directement transférés à l'Homme. Les expérimentations décrites dans ce projet seront conduites sur des animaux vivants vigiles dans le plus strict respect des règles et lois éthiques en vigueur. Nous utiliserons 100 souris sauvages au total. Pour le respect de la règle des 3R, la solidité de nos hypothèses de travail (vérifiée par des expériences pilotes) et la qualité de la mise en œuvre des procédures (basée sur une expertise internationale reconnue de l'expérimentateur) permettra de contrôler le nombre des animaux. Dans le respect du R de raffiner, les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures, soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupes sociaux

et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Pour cela, les chirurgies stéréotaxiques se feront sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès leur réveil et qui sera maintenue tant que l'animal montre des signes de souffrance. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

11430 Depuis plus de 50 ans l'hypothèse de la consolidation domine la littérature concernant la mémoire. D'après cette hypothèse, le souvenir a besoin de temps avant d'être définitivement enregistré dans la mémoire. Cette période d'élaboration du souvenir, qui se déroule pendant plusieurs heures, est appelée phase de consolidation. Cette hypothèse est basée sur des expériences montrant que des traitements délivrés pendant cette phase de consolidation créent une amnésie qui est d'autant plus forte que le traitement est appliqué rapidement après l'apprentissage. Au début des années 2000, de nouvelles données ont suggéré qu'un processus similaire appelé reconsolidation, se mettait en place à chaque fois que le souvenir était rappelé. Nos données récentes nous ont permis de proposer une autre hypothèse. Nous avons montré que l'amnésie provoquée par un traitement administré (en systémique ou en intracérébral) après un apprentissage ou après sa réactivation pouvait être abolie si ce même traitement était également délivré peu avant l'épreuve de rétention. Ces données indiquent que l'amnésie n'est pas due à une absence de souvenir, mais à une incapacité à se rappeler. Les traitements amnésiants sont tous des traitements sévères qui modifient l'état interne des sujets. Délivrés juste après un apprentissage, l'état interne induit est intégré au souvenir de l'apprentissage. Lors du test de rétention, l'animal revenu à son état basal, ne peut restituer l'information acquise dans un état modifié, sauf si il est replacé dans l'état modifié. Ce phénomène est bien connu sous le nom de dépendance de l'état. Ainsi contrairement à ce que l'on croit depuis 50 ans, l'amnésie n'est pas due à une perte du souvenir, mais à une incapacité à récupérer l'information à cause d'une modification de l'état interne induite par le traitement amnésiant.

Notre but dans les expériences proposées est de compléter nos données initiales et de les étendre à d'autres traitements. Pour bien établir la généralité du phénomène, ces expériences seront menées avec des traitements délivrés soit en systémique, soit directement au sein des structures cérébrales impliquées dans le traitement du souvenir, et administrés soit après l'apprentissage soit après la réactivation de cet apprentissage. Nous étudierons plusieurs drogues, celles les plus classiquement utilisées pour induire une amnésie rétrograde. Ces drogues ne sont pas connues pour avoir d'autres conséquences notables. Notre choix s'est porté sur le rat parce que c'est un mammifère, dont le fonctionnement cérébral est proche de celui de l'homme. C'est l'espèce la plus étudiée avec la souris pour ce type d'étude. De plus, ces données viennent en complément d'autres études préalablement réalisées sur le rat.

Pratiquement, les expériences proposées consistent en une simple administration de drogues qui seront délivrées après l'apprentissage et /ou avant le test de rétention. L'apprentissage comporte deux légers chocs électriques délivrés pendant 0,5 sec. Sur l'ensemble des 408 rats prévus pour la réalisation de ce projet, seuls 15% subiront une chirurgie pour l'implantation d'une canule nécessaire à l'administration intracérébrale de drogue. Le nombre d'animaux est déterminé au plus juste afin de pouvoir obtenir des différences significatives entre nos groupes. Toutes les dispositions nécessaires seront prises pour réduire la douleur et l'inconfort des animaux pendant toute la durée de l'expérience. (Analgésie, points limites...)

Cette étude est essentielle pour invalider l'hypothèse de la consolidation et permettre de la remplacer par le concept d'intégration. Cette notion d'intégration permet d'envisager la possibilité d'interventions sur des souvenirs pathologiques comme ceux résultants d'un traumatisme ou d'une dépendance à des substances d'abus. En effet cette hypothèse suggère qu'il est possible d'intégrer de nouvelles informations qui permettront de diminuer le caractère pathologique de ces souvenirs.

Avant cette étape, il est indispensable de montrer que les souvenirs sont malléables et peuvent intégrer des informations.

11431 La parvovirose est une maladie virale du canard de barbarie à transmission horizontale provoquant mortalité, retard de croissance, déplumement ainsi que des troubles locomoteurs et respiratoires importants. La maladie touche les canetons jusqu'à 5 semaines d'âge. La prévention de cette maladie repose sur une vaccination des reproducteurs et des canetons.

La maladie de Derzy touche l'oie et le canard, elle est due à un autre parvovirus. Elle touche les canetons (et oisons). Elle entraîne des retards de croissance importants donnant le syndrome "nanisme bec court". La prévention repose sur une vaccination des reproducteurs et des canetons.

Les productions des vaccins actuels contre ces deux maladies reposent sur l'utilisation d'animaux. Des élevages de canes EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique) servent à la production d'œufs sans anticorps qui permettent la multiplication du virus. Ce type de production occasionne de nombreuses ruptures de disponibilité de ces vaccins.

L'objectif de ce projet est le développement d'un vaccin bivalent (parvovirose + maladie de Derzy) avec multiplication des virus sur cellules en laboratoire (pas d'utilisation d'animaux lors de la production des lots du vaccin).

La maladie de Derzy est présente en France depuis les années 1970. La parvovirose du canard depuis les années 1990. Ces virus étant très résistants, ces maladies circulent en permanence sur le territoire.

Un vaccin produit par multiplication des virus sur cellule permettra d'assurer la disponibilité permanente d'une prévention de ces maladies des canards.

Les essais prévus sur animaux sont ceux uniquement réalisables sur animaux, le test permettant de vérifier l'inactivation du principe actif viral du vaccin est réalisé sur des cultures cellulaires, ce qui permet d'éviter l'utilisation d'animaux.

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque essai est celui exigé par la pharmacopée européenne. Pour les essais mis en place pour obtenir des informations scientifiques, le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire afin d'obtenir des résultats significatifs.

Les surfaces d'hébergement sont en accord avec la directive 2010 63 UE.

Les conditions d'hébergement sont vérifiées quotidiennement (éclairage, température, hygrométrie, nourriture, abreuvement).

Une procédure d'évaluation des points limites des animaux est mise en place. Cela permet d'évaluer toute douleur physique ou psychique sévère, souffrance ou état moribond. La procédure permet, le cas échéant, un arrêt du protocole, sa modification, l'administration d'un traitement symptomatique, voire l'euthanasie de l'animal.

L'état des animaux est vérifié quotidiennement par une personne compétente, et le vétérinaire responsable est consulté afin de prendre d'éventuelles mesures nécessaires.

Ces essais seront réalisés sur le canard de barbarie, il s'agit de l'espèce cible du vaccin, sensible aux deux parvovirus, permettant d'apporter les informations les plus pertinentes.

Un maximum de 960 animaux utilisés est prévu pour le développement.

11432 « L'Ulcère de Buruli (UB) est une maladie infectieuse tropicale générant une infection cutanée impliquant *Mycobacterium ulcerans*, dérivée d'un ancêtre commun avec *Mycobacterium marinum*. De nombreux cas d'UB ont été décrits dans plus d'une trentaine de pays particulièrement en Afrique, mais aussi en Australie, en Asie de Sud Est voir même en Amérique. L'UB est la 3ème mycobactériose la plus répandue dans le monde après la tuberculose et la lèpre.

A ce jour, le mode de transmission à l'homme et le rôle des animaux comme « réservoirs » n'est pas encore déterminé, limitant la prophylaxie au niveau des zones endémiques. Récemment, l'ADN de *M. ulcerans*, l'agent causal de l'UB a été détecté dans les fèces d'aulacodes, un rongeur qui sévit à proximité des populations au niveau des zones endémiques à l'UB. Cette découverte

suggère l'implication d'aulacodes dans l'épidémiologie d'UB. Pour vérifier son degré d'implication, nous aimerions répondre à 3 questions majeures :

- a) Est-ce que *M. ulcerans* survit après ingestion par voie naturelle chez les animaux choisis pour le projet ?
- b) *M. ulcerans* est-elle capable de transloquer dans le sang/ système lymphatique à partir du tube/ système digestif ?
- c) Dans l'affirmative, une translocation est-elle possible sur une lésion sous-cutanée réalisée sur le même animal ?

L'ingestion « naturelle » sera réalisée en mélangeant à l'eau une solution contenant une concentration déterminée de *M. ulcerans*. La consommation d'eau contaminée par *M. ulcerans* sera rigoureusement suivie les premières 24 heures avant d'être remplacée par de l'eau « propre ».

Cette étude nous aidera à apporter des informations concernant la viabilité du *M. ulcerans* dans les urines, les fèces et le tube digestif mais aussi dans le sang et les ganglions lymphatiques après consommation d'un volume défini d'eau.

L'hypothèse d'une potentielle translocation du système digestif vers une lésion sous-cutanée sera testée sur les mêmes animaux afin de réduire le plus possible le nombre d'animaux par expérimentation.

Nous souhaitons utiliser des rats mâles et femelles d'origine Long Evans qui sont généralement les plus calmes et les moins susceptibles d'être stressés en hébergement individuel.

Remplacement :

Ce projet s'appuie sur la présence de l'agent étudié *M. ulcerans* dans les fèces de différents animaux dans des zones endémiques de l'UB. Les réponses que nous pourrions apporter aux 3 questions posées au début de ce résumé impliquent et justifient l'utilisation d'animaux vivants. Nous avons choisi les rats dans notre modèle pour la similitude de comportements alimentaires et quotidiens avec l'espèce endémique : les aulacodes appelés aussi Agouti en Afrique de l'Ouest.

Réduction :

Afin de minimiser le nombre d'animaux, nous avons estimé à l'aide d'un logiciel de statistiques expérimentales qu'un nombre minimum de 6 individus par groupe était nécessaire par procédure et par sexe. Afin de minimiser le nombre total d'animaux nous avons estimé avoir besoin de seulement 2 témoins par groupe et par sexe. Ce qui donne un nombre de 8 rats par groupe et par sexe. Soit pour la totalité de nos deux procédures 32 rats.

Raffinement :

Chaque rat sera stabulé dans une cage individuelle au travers de laquelle chaque individu peut voir son voisin afin de diminuer le stress lié au confinement individuel dans un même portoir ventilé durant la totalité de l'expérimentation qui pourra s'étendre jusqu'à 3 ou 5 mois. Chaque animal sera suivi de manière quotidienne, un enrichissement approprié sera disposé dans chaque cage (cylindres cartons, bâtonnets de bois et/ou cylindre de fibres de cellulose compact) et une grille de Morton et Griffiths sera utilisée pour suivre la douleur des animaux infectés. Tout signe de douleur et/ou souffrance entraînera l'arrêt de la procédure et les animaux seront euthanasiés par injection de surdosage de Dolethal.

11433 Il a été observé dans une dizaine d'études que les patients ayant bénéficié d'injection d'anesthésiques locaux seuls ou en association à une anesthésie générale pour une chirurgie oncologique avaient de manière significative moins de récurrences métastatiques et une meilleure survie comparés aux patients ayant eu qu'une anesthésie générale. Des premières études *in vitro* ont montré que les anesthésiques locaux présentaient une cytotoxicité directe sur les cellules cancéreuses et avaient un rôle crucial sur le système immunitaire. Nous formulons l'hypothèse que les anesthésiques locaux pourraient avoir une propriété anti-tumorale immunitaire cytotoxique. En pratique clinique, les patients cancéreux ne reçoivent pas un seul traitement antinéoplasique isolé mais une association de traitement.

L'objectif de notre projet est d'étudier l'efficacité des anesthésiques locaux seuls ou en association avec les traitements anti tumoraux utilisés couramment en clinique (chimiothérapie, immunothérapie.). Afin de reproduire la pratique clinique réalisée chez l'homme, ce projet doit être réalisé sur un organisme vivant de type mammifère. En effet, dans un modèle vivant, les agents thérapeutiques sont modifiés suite au métabolisme et les effets biologiques observés peuvent être différents de ceux obtenus précédemment sur des cellules. De plus, il n'existe pas à ce jour de modèles alternatifs pour étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale.

Les effets des traitements anticancéreux seuls ou en association impliquent des processus multiparamétriques impliquant des sécrétions humorales et des répercussions immunitaires non modélisables ailleurs que dans un être vivant entier. On ne peut donc se contenter de l'étudier uniquement *in vitro*, il est indispensable d'avoir recours à l'animal de laboratoire. Notre hypothèse est que l'association des anesthésiques locaux aux traitements anti-cancéreux conventionnels potentialiseraient la réponse anti-tumorale. L'utilisation d'animaux vivants est indispensable pour étudier l'immunité et l'efficacité des traitements combinés sur la réponse anti-tumorale. La compréhension de cette potentialisation et sa reproduction *in vivo* ouvrirait la possibilité d'associer systématiquement ces agents au cours des chirurgies oncologiques chez l'homme afin de diminuer le risque de récurrences grâce à une destruction potentialisée des cellules tumorales résiduelles.

Dans ce projet, l'ensemble des expériences a été conçue afin de respecter les exigences de réduction et raffinement et permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal.

Seul le nombre minimal de souris, calculé mathématiquement, sera utilisé dans l'étude : 1020. Les animaux disposeront d'un milieu enrichi. Les animaux seront observés quotidiennement afin de vérifier leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict (avec échelle d'hétéroévaluation relevant des signes de mal-être tels que : perte de poids, alopecie, agressivité, prostration, agitation, petits yeux, oreilles en arrière.) permettra de vérifier l'absence de mal-être. Des mesures seront prises pour limiter au maximum le stress et la douleur au cours des expériences. Les procédures seront faites sous anesthésie générale ou locale pour les simples injections. Un aliment plus énergétique et appétent sera mis à disposition des animaux au décours des procédures (DietGel haute énergie). Des points limites précoces seront strictement respectés et appliqués.

11434 Les mycoses sont des infections qui touchent la peau, les muqueuses, les ongles et le cuir chevelu. Elles sont dues aux champignons, principalement les « levures » et les « dermatophytes ». Ces infections sont rarement menaçantes pour la vie des personnes saines, mais sont souvent inesthétiques et affectent la qualité de vie. Elles sont parfois sévères chez les patients immunodéprimés. Le traitement des mycoses est long, et consiste à administrer des antifongiques par voie orale ou locale avec pour dilemme le choix entre la voie orale qui risque d'avoir des effets indésirables systémiques et des interactions médicamenteuses et la voie locale qui risque d'être insuffisamment efficace. L'arrêt prématuré du traitement favorise la persistance et la récurrence de l'infection. Le développement de nouveaux médicaments pour un traitement de courte durée pourrait améliorer la prise en charge.

Le but de ce travail est de tester la tolérance locale et l'efficacité de 5 molécules (M1, M2, M3, M4 et M5) en cours de développement au sein de notre institution, en comparaison avec des antifongiques utilisés en clinique : la terbinafine (infection à dermatophytes) et la ciclopirox olamine (infection à *Candida albicans*).

Dans un premier temps nous mettrons au point deux modèles chez la souris dans deux études pilotes. L'une sera pour le modèle d'infection à *C. albicans*, l'autre pour l'infection aux dermatophytes. Des souris BALB/c (n=6 par étude pilote, 3 mâles et 3 femelles) seront nécessaires. L'infection sera effectuée par simple dépôt sur la peau de la zone dorsale interscapulaire d'une solution infectante. Ces études pilotes permettront d'identifier d'éventuels points limites témoignant

de douleur ou d'inconfort des animaux ainsi que de déterminer la date d'apparition des lésions et leur évolution spontanée sur une période de 21 jours.

Dans un second temps nous testerons la tolérance locale. Dans un troisième temps nous évaluerons l'efficacité thérapeutique des molécules, en comparaison à des contrôles. Le traitement sera appliqué quotidiennement à partir du jour d'apparition de la lésion tel que déterminé d'après les études pilotes et pendant 5 jours. Les traitements seront déposés sur la zone d'intérêt. L'efficacité des molécules sera évaluée tout au long et à la fin du traitement par 3 techniques : une évaluation macroscopique des signes cliniques, des prélèvements locaux par écouvillonnages et identifications des champignons et des analyses histologiques de prélèvements post-mortem des lésions.

Ce protocole tient compte de la règle des 3 R. Le raffinement est respecté car le protocole est basé sur des publications antérieures ayant montré l'innocuité de ce type d'infection qui ne provoque pas d'inconfort et aucun décès des animaux. Les animaux seront placés 3 par cage de plexiglas dans une armoire ou portoir ventilé. Ils auront accès à la nourriture et aux boissons *ad libitum* et seront surveillés quotidiennement. Avant l'infection, un enrichissement à base de cellulose sera systématiquement rajouté à la cage. Après l'infection, pour éviter la contamination par les petits fragments, des enrichissements réutilisables de type igloo seront utilisés.

Les procédures de lésions du modèle à dermatophytes seront effectuées sous anesthésie générale par injection d'un cocktail de kétamine (90 mg/kg) et xylazine (10 mg/kg) par voie intrapéritonéale (aiguille 25-27G), ce qui évitera l'inconfort des souris.

Le simple dépôt des champignons et des antifongiques à la surface permet d'éviter les injections. Les prélèvements par écouvillonnage de surface sont des procédures non invasives. Il n'est pas attendu de douleur après l'infection ni dans les heures ou jours qui suivront, mais des démangeaisons seront peut-être ressenties. En cas de lésion ulcérate ou suppurée, ou de modifications comportementales ou du poids correspondant à un point limite évocateur de douleur tel que défini dans le chapitre spécifique, les animaux recevront du tramadol en injection sous-cutanée. Cependant, nous estimons que les animaux ne seront exposés qu'à une sensibilité locale minimale nécessaire aux objectifs de l'expérience. Les euthanasies seront effectuées à la fin des études par dislocation cervicale.

Pour réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons les mêmes groupes d'étude de tolérance locale pour le modèle candida et le modèle dermatophytes puisque les molécules thérapeutiques testées sont les mêmes. De plus aucun test de DL50 ne sera effectué.

Des études préliminaires *in vitro* de screening ont permis de sélectionner les 5 molécules les plus actives parmi une vingtaine pour les évaluer *in vivo*, ce qui réduira le nombre de groupes. Ceci a permis de remplacer les études animales par des tests *in vitro*.

Les études pilotes porteront sur 6 lots pour chaque modèle (= 12 souris) et l'étude de tolérance aux molécules portera sur 6 lots de 3 souris (= 18 souris). Les modèles d'infections à candida et à dermatophytes porteront sur 8 lots de 6 souris chacun (= 16 lots de 6 souris pour les 2 modèles, = 96 souris). Au total 126 souris seront nécessaires. Nous élèverons ce chiffre à 130 souris pour prendre en compte les cas inexploitable. Le détail de ce calcul se trouve dans le chapitre spécifique.

11435 L'objectif de ce projet est d'essayer de corriger le phénotype locomoteur dans des souris modèles d'une maladie neurodégénérative (FXTAS) par injection intracérébrale d'oligonucléotide antisens.

FXTAS pour Fragile X Tremor Ataxia Syndrome, est une maladie génétique neurodégénérative due à une mutation de l'ADN qui entraîne une mort neuronale, touchant principalement le cervelet et le cortex conduisant à des tremblements, une perte d'équilibre (ataxie) et des troubles du comportement et de la mémoire. Nous avons développé un modèle de souris transgénique exprimant la mutation responsable de FXTAS. Ces souris présentent des altérations locomotrices dès l'âge de 4 mois et meurent vers un an. De plus, nous avons identifié des molécules thérapeutiques (des oligonucléotides antisens modifiés chimiquement) qui permettent d'éliminer

dans des modèles cellulaires de FXTAS l'expression de la mutation responsable de FXTAS. Notre objectif est donc de tester ces molécules thérapeutiques dans notre modèle de souris FXTAS.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle *in vitro* ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier les altérations de la locomotion typiques de cette maladie neurodégénérative. De plus, nous avons établi que ce modèle de souris FXTAS est un bon modèle d'étude de cette maladie, du fait des similitudes avec la pathologie humaine.

Raffinement :

Afin de limiter la douleur induite par les symptômes, nous n'étudierons que les premières étapes de l'apparition des symptômes et les animaux seront euthanasiés avant que la phase terminale de la maladie n'apparaisse. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance. Enfin, pour éviter tout phénotype dommageable chez les animaux servant à établir et maintenir la lignée, nous utilisons une technique d'expression (recombinase CRE) de la maladie conduisant à l'apparition d'un phénotype dommageable uniquement chez les animaux à étudier.

Réduction :

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, nous prévoyons une étude pilote sur 24 animaux afin de confirmer les coordonnées des zones d'injection (ventricules), de choisir le meilleur oligonucléotide antisens parmi deux candidats et vérifier que l'injection de la dose maximale d'oligonucléotide antisens (150 nanomole) prévue n'est pas toxique, puis une étude complète sur 84 souris afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 108 souris. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux prélevés pour éviter des doublons des procédures expérimentales.

11436 L'objectif du projet est d'évaluer, chez la souris, les réponses immunitaires stimulées par un vaccin ADN contre la leucose bovine causée par l'infection avec le virus de la leucose bovine (BLV) chez les bovins infectés. Ce vaccin à base d'un acide nucléique ADN est un plasmide portant le génome du BLV rendu défectif pour la réplication par délétion du gène de l'intégrase du virus. De plus les séquences répétées terminales (LTR) du BLV portant les promoteurs ont été remplacées par les LTRs du lentivirus de la chèvre (virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre) CAEV. L'injection de cet ADN permettrait l'expression constitutive des antigènes du BLV qui vont induire des réponses immunes pouvant protéger efficacement contre le BLV pathogénique.

Dans le cadre de cette expérimentation nous utiliserons 56 souris BALB/c qui seront répartis en 3 groupes de 16 animaux et un groupe contrôle de 8 souris. A l'heure actuelle, il n'existe pas de système *ex vivo* ou *in vitro* permettant d'évaluer les réponses immunes cellulaires dirigées contre des antigènes. Le modèle murin est le petit animal le plus adéquat pour l'évaluation de l'antigénémie et remplace dans un premier temps l'utilisation des bovins. L'utilisation de groupes de 8 souris par condition permet d'obtenir des résultats statistiquement fiables même en cas de réduction accidentelle d'un animal de l'effectif initial et ce, sans être obligé de recommencer l'expérimentation (Réduction). La méthodologie et les techniques utilisées ont déjà été employées avec succès pour d'autres prototypes vaccins similaires (Raffinement) : la douleur de l'immunisation par injection intra-musculaire est légère (comparable à celle appliquée chez l'homme) et ne nécessite pas d'anesthésie préalable, le processus inflammatoire au point d'injection reste limité étant donné l'absence d'adjuvant, aucune ulcération n'est observée suite à la vaccination ADN, le prélèvement sanguin unique est réalisé en toute fin de procédure sur les animaux profondément anesthésiés. L'entretien des animaux et l'observation de leur état sanitaire sont réalisés quotidiennement par le personnel qualifié.

11437 La diversification des espèces de poissons d'élevage devient aujourd'hui un enjeu majeur permettant à la fois une pisciculture durable et respectueuse de l'environnement tout en répondant

à la demande grandissante des consommateurs en produits aquatiques. Cette approche nécessite la domestication de nouvelles espèces, un processus qui affecte les fonctions physiologiques des animaux et notamment leur reproduction. La domestication chez la perche commune *Perca fluviatilis* a été rendue possible depuis quelques années grâce à la mise en place d'un programme contrôlant la température et la lumière sur une période de 9 mois et permettant ainsi d'induire la reproduction de cette espèce en captivité. Cependant, des défauts de développement des embryons sont observés et peuvent être liés à des facteurs très variés parmi lesquels l'alimentation. Dans le cadre de ce travail l'intérêt sera porté sur le rôle de l'alimentation sur les capacités de reproduction chez la perche. La composition des aliments en lipides joue un rôle essentiel dans le développement des embryons dans les œufs. Ainsi, l'objectif de cette étude sera de comparer l'effet de trois régimes alimentaires différents plus ou moins enrichis en lipides sur la maturation de la gonade et les conséquences sur le développement des embryons chez la perche.

Au total, 1500 poissons seront étudiés afin de suivre régulièrement l'évolution de l'incorporation des lipides dans les gonades chez les femelles et d'obtenir un nombre de pontes suffisant pour valider statistiquement l'étude, ceci en tenant compte du sexe ratio et du fait que la perche est grégaire et nécessite la présence d'un groupe pour pondre dans des bonnes conditions (réduction). Au cours du projet, 5 procédures seront mises en œuvre. Au début de l'expérimentation, les poissons seront : (1) identifiés par la pose d'une micropuce électronique afin d'obtenir un suivi individuel (procédure n°1), (2) sexés et suivis par échographie afin d'identifier les femelles et développer une méthode non invasive pour suivre la maturation des gonades (procédure n°2). Par la suite, les trois groupes de poissons seront constitués et soumis aux trois régimes alimentaires choisis (3 bassins/régime alimentaire). Sur les trois groupes, des prélèvements de sang et d'organes seront réalisés régulièrement tout au long du cycle de reproduction (7 femelles/bassins/mois) afin d'identifier et quantifier les lipides accumulés dans les œufs en développement (procédure n°3). Un mois avant la ponte, un prélèvement d'ovocytes par cannulation sera effectué afin de prédire leur moment de ponte et regrouper les femelles en fonction de l'état de maturité des gonades (toutes les femelles au même stade seront mises dans le même bassin) (procédure n°4). Cette procédure permettra d'avoir des lots de poissons homogènes qui pondront en même temps et ainsi éviter de trop stresser les poissons lors de la procédure suivante (raffinement). Après la ponte, des fécondations artificielles seront effectuées pour évaluer la qualité des œufs et suivre le développement embryonnaire. Pour cela nous procéderons à des prélèvements de pontes chez les femelles et de sperme chez les mâles sur les adultes (procédure n°5). Le succès du développement embryonnaire sera suivi à travers l'estimation de taux de survie, les taux d'éclosion et les taux de malformations des larves. Les procédures seront réalisées sous anesthésie pour supprimer toute douleur et angoisse des animaux au cours de l'expérimentation (Raffinement).

Ce travail portant sur l'alimentation et la reproduction de la perche ne peut être remplacée par des expérimentations *in vitro* (remplacement). Les résultats permettront : (i) de rationaliser et optimiser les protocoles d'alimentation des géniteurs adultes et (ii) d'améliorer les connaissances sur la physiologie de la reproduction de la perche.

11438 Le segment initial de l'axone (AIS) est le site où les neurones génèrent leur langage, sous formes d'impulsions électriques. Ces dernières sont ensuite propagées le long de l'axone, pour pouvoir être communiquées aux cellules cibles de chaque neurone sur lesquelles l'axone projette. L'AIS présente une plasticité structurelle et moléculaire qui permet au neurone de moduler son langage. Cependant, des altérations de l'AIS, observées dans plusieurs pathologies neurodégénératives, peuvent engendrer des dysfonctionnements neuronaux majeurs et représentent donc une cible thérapeutique d'intérêt.

La Sclérose en Plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central (SNC), qui se caractérise par une inflammation, aboutissant à une perte de la gaine de myéline autour des axones. Il a été récemment démontré que l'AIS est altéré dans un modèle murin d'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE), modèle animal de SEP couramment utilisé, ainsi que dans des tissus de patients atteints de SEP.

Les cellules microgliales sont les cellules immunitaires résidentes du système nerveux central (SNC), aux prolongements très dynamiques, qui participent au maintien de l'homéostasie du SNC mais aussi aux processus inflammatoires dans plusieurs pathologies neurodégénératives, dont la SEP. Elles assurent ces rôles par le biais de sécrétions de molécules mais aussi de contacts physiques.

Or, un tout nouveau contact physique a été découvert entre des prolongements microgliaux et des AIS dans différentes régions du SNC et à différents stades. Cette interaction pourrait i) permettre aux microglies de contrôler la plasticité de l'AIS, voire ses altérations dans des contextes pathologiques comme la SEP et/ou ii) permettre aux neurones, en fonction de leur activité, de contrôler celle des cellules microgliales et notamment leurs rôles protecteurs et/ou destructeurs. Ce contact entre AIS et microglie pourrait donc se révéler être une nouvelle cible thérapeutique pour plusieurs pathologies neurodégénératives.

Le présent projet a pour objectif d'étudier cette interaction entre AIS et microglie dans un contexte normal et pathologique, et ce chez la souris *in vivo* afin de se rapprocher le plus possible de contextes humains.

Le nombre d'animaux sera le plus petit possible, mais suffisant pour permettre une analyse statistique des résultats. Ce projet nécessitera 620 souris pour une durée de 5 ans. Un grand soin sera porté afin d'empêcher tout stress ou toute souffrance aux animaux, notamment à travers un suivi clinique journalier (utilisant l'échelle validée par le comité d'éthique) et les conditions d'élevage. Enfin, la souris apparaît comme un modèle animal de choix irremplaçable pour ce projet d'étude, réfléchi dans le souci de garantir le bien-être animal.

11439 Nos recherches ont pour but de développer de nouvelles techniques d'acquisition *in vivo* fondées sur la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), plus communément appelée IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et SRM (Spectroscopie par Résonance Magnétique). Le but est d'améliorer les informations anatomique, biochimique et biomécanique sur les tissus vivants pour mieux diagnostiquer certaines pathologies. Les nouvelles techniques développées dans ce projet consistent à écrire partiellement ou intégralement de nouvelles séquences RMN parfois couplées à un dispositif d'élastographie ou optique. Ces nouvelles séquences et /ou dispositifs nous permettront de mettre en place de nouveaux biomarqueurs jusqu'ici inexistantes ou plus simplement d'améliorer la qualité des images RMN existantes. Quatre techniques seront utilisées : l'excitation RMN par contrôle optimal pour optimiser le signal ou le contraste dans l'image, l'élastographie du foie pour évaluer l'altération de ses propriétés mécaniques, l'imagerie spectroscopique multidimensionnelle pour quantifier la structure chimique des tissus et la synchronisation optique pour améliorer l'imagerie cardiaque. Dans le cas où nos recherches aboutiraient, ce projet permettra non seulement de passer à la phase de recherche sur l'homme (bénéfices dans le monde hospitalier) mais aussi de valider des techniques de diagnostic sur le petit animal. Ainsi ce type de techniques non-invasives pourrait se démocratiser et devrait donc diminuer des techniques de type invasif comme des prises de sang, biopsies, autopsies ... Ceci aura pour effet de diminuer le nombre et la souffrance des futurs animaux faisant l'objet d'études similaires.

Toutes ces techniques basées sur la RMN intégreront des procédures non-invasives et non-ionisantes où seul le dommage occasionné sur l'animal sera l'anesthésie générale gazeuse. Mais avant cela, la grande majorité des développements, nécessitant la programmation des imageurs RMN, sera réalisée sur des solutions, échantillons tests de composition parfaitement connue. Une fois la technique mise au point, nous devons la valider *in vivo*. La validation se fera sur des souris saines et une même souris sera examinée plusieurs fois. De par notre expérience, nous évaluons la fréquence moyenne des examens à 11 jours par an et par animal ce qui représente 2 heures d'anesthésie par mois et par animal. Ainsi, nous utiliserons un nombre très réduit d'animaux et nous estimons de façon grossière un remplacement des animaux chaque année. Il va de soi qu'un groupe d'animaux dépassant un an en âge ne sera pas euthanasié si ce dernier ne présente aucun comportement inhabituel laissant suggérer un mal-être. Pour développer une vie communautaire, 6 souris dans une cage seront nécessaire chaque année pour que le projet soit correctement mené, soit 30 souris saines sur la durée totale du projet soit 5 ans. La RMN est une technique peu sensible

et il se peut que le signal provenant d'un organe tel que le foie ou le cerveau ne soit pas suffisant pour le détecter. Nous aurons alors besoin de rats présentant des organes plus gros. Donc si et seulement si les études sur souris ne permettent pas de valider nos techniques alors nous aurons besoin de 4 rats placés dans une cage. Si ce manque de signal se révèle chaque année, nous utiliserons alors au maximum 20 rats sur toute la durée du projet (5 ans). Une attention toute particulière sera faite sur les animaux vieillissants. Les animaux montrant une perte d'appétit, des difficultés locomotrices ou un isolement seront replacés dans des structures universitaires et euthanasiés pour dissection lors de travaux pratiques ou pour des prélèvements d'organes.

Les souris saines permettent de déterminer la faisabilité *in vivo* de nouvelles techniques d'acquisition et de publier dans des revues scientifiques le principe de la technique. Après avoir évalué et caractérisé les capacités des techniques de contrôle optimale, d'élastographie et de SRM en terme de sensibilité de détection, reproductibilité des mesures, nous serons à même de préparer une nouvelle demande d'autorisation pour travailler sur des animaux malades (e.g stéatose, fibrose et cirrhose, ou tumeurs) et d'estimer le nombre optimal d'animaux à utiliser. Les techniques pour l'aide au diagnostic que nous développons sont non invasives : applicables à terme aussi bien à l'homme qu'à l'animal, elles offrent une alternative à la biopsie pour laquelle les risques de complications et de souffrance devraient diminuer.

11440 Il est aujourd'hui acquis que l'entraînement modéré chronique est efficace mais qu'en intensifiant l'exercice physique, il est possible d'améliorer encore les capacités métaboliques de l'organisme et notamment au niveau du fonctionnement et de la biogenèse mitochondriale (formation de nouvelles mitochondries), organelles producteurs d'énergie au niveau des tissus (muscles en particulier). L'aspect « biogenèse mitochondriale » est un mécanisme qui est peu compris aujourd'hui, aspect sur lequel nous souhaitons porter notre attention au travers de cette demande d'autorisation de projet.

Nous nous proposons d'étudier les effets de deux modalités d'entraînements sur la biogenèse mitochondriale chez le rat Wistar sain. Cette étude préliminaire consistera à mettre en œuvre une nouvelle modalité d'entraînement (entraînement intensif) et de la comparer à la modalité d'entraînement continu déjà maîtrisée par notre équipe. A terme, lorsque ces protocoles seront validés, nous souhaitons étudier ces mécanismes sur notre modèle de rat présentant une pathologie métabolique.

30 rats Wistar mâles seront stabulés sur une période de 12 semaines consécutives (du sevrage des animaux à la fin du protocole). Nous étudierons l'effet de 6 semaines d'entraînement continu modéré et d'entraînement intensif comparativement à des animaux sédentaires ne réalisant pas d'exercice physique. Ces animaux feront l'objet de 9 procédures :

Identification des animaux (procédure légère), mesure de pression artérielle en non invasif (procédure légère), mesure de glycémie à jeun (procédure légère), mesure de la microcirculation cutanée par laser doppler (procédure légère), habituation des animaux au tapis (procédure légère), test de performance maximale de course (procédure sévère), entraînement continu ou intermittent (procédure légère et modérée), test d'hyperglycémie provoquée (procédure modérée). A l'issue de ces 12 semaines, les animaux sont euthanasiés pour prélèvement d'organes (cœur, muscles striés squelettiques, foie, tissu adipeux, aortes thoracique et abdominale, sang). Ces prélèvements permettront de doser des activités enzymatiques validant le protocole d'entraînement et des capacités anti-oxydantes de l'organisme, de réaliser de la biologie moléculaire pour évaluer l'impact de l'entraînement sur la biogenèse mitochondriale (plus de 10 transcrits de gènes sont ciblés).

Nous travaillons dans le souci de la règle des 3 R :

* Réduction : le nombre d'animaux est réduit au minimum statistique requis pour mener à bien ce projet.

* Raffinement : tout au long du protocole, les conditions de stabulation sont réalisées dans un souci de bien-être de l'animal. Toutes les procédures expérimentales sont réalisées par des personnes formées et habituées à travailler avec des animaux de laboratoire, dans des conditions d'analgésie

et d'anesthésie conforme à la réglementation et en accord avec la gravité des procédures. Les animaux sont suivis quotidiennement.

* Remplacement : L'utilisation du modèle murin est inévitable car nous travaillons sur les mécanismes intégratifs et donc sur l'organisme entier.

11441 L'atteinte rectale des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), et particulièrement la rectite (inflammation rectale) isolée de rectocolite hémorragique (RCH), a une prévalence de 44 à 60%. 10% des rectites sont réfractaires aux thérapeutiques usuelles. En pratique, des traitements sont utilisés par voie systémique (intraveineuse ou sous cutanée) pour les rectites réfractaires avec une efficacité histologique mal connue et des effets secondaires inhérents à leur utilisation. Bien que complexe et multifactorielle, la physiopathologie de l'inflammation muqueuse de la RCH est la résultante d'une interaction étroite entre le microbiote (ensemble des bactéries intestinales) et les cellules épithéliales. Il est démontré que cette interaction est la conséquence d'une altération de la barrière de mucus dans la RCH. Aussi, une approche expérimentale permettant d'augmenter la protection par l'ajout de composés exogènes remplissant le rôle du mucus sur l'inflammation nous paraît importante à valider.

L'objectif de notre étude est de proposer un moyen thérapeutique local susceptible d'endiguer le processus inflammatoire dans un contexte de rectite réfractaire sans générer d'effets secondaires. Le but principal est de faciliter la cicatrisation muqueuse par l'apport combiné d'une matrice extracellulaire exogène indispensable à la régénération tissulaire et d'un traitement anti-inflammatoire et cicatriciel. Ce travail repose sur l'utilisation de biogels locaux couplés à des anti-inflammatoires utilisés dans le traitement de la RCH dans un modèle murin d'inflammation rectale ou colique et l'évaluation de son efficacité. Des études préliminaires réalisées dans notre laboratoire ont démontré l'efficacité d'un polymère face à la colite justifiant son utilisation dans les expériences présentées dans ce projet. Une forme chimiquement modifiée de ce polymère susceptible d'augmenter son efficacité est maintenant disponible.

Notre étude portera sur le traitement de souris, chez lesquelles une rectite ou une colite sera induite selon deux modèles chimiques reconnus d'instillation rectale (TNBS) ou de traitement par le dextrane sulfate (DSS) dilué dans l'eau de boisson. La première étape concernera la sélection du meilleur polymère (forme native ou forme cationique) après avoir évalué leur pouvoir anti-inflammatoire respectif. Ces polymères seront instillés par lavements quotidiens. L'efficacité thérapeutique sera évaluée par une notation histologique réalisée en aveugle par un pathologiste spécialisée. Une fois ce polymère sélectionné nous évaluerons son efficacité après couplage avec un anti-inflammatoire dans les deux modèles expérimentaux d'inflammation (TNBS et DSS). La pharmacocinétique du produit sera également évaluée grâce au couplage de l'hydrogel avec un produit de contraste visible à l'IRM et évalué par IRM itératives.

Les colites au TNBS ou au DSS seront réalisées sur des périodes de 5 et 7 jours respectivement sous anesthésie générale gazeuse. L'hydrogel couplé ou non à l'anti inflammatoire et l'anti-inflammatoire seul seront administrés par voie rectale quotidiennement sous forme de lavements pendant une minute. Une première procédure concernant 30 animaux sera réalisée afin de déterminer la dose optimale du polymère sur l'inflammation induite par le TNBS pendant 5 jours. Cette expérience permettra de sélectionner le polymère le plus actif sur lequel sera fixé chimiquement l'anti-inflammatoire. Une seconde procédure concernant 60 animaux distribués en 4 groupes consistera à évaluer l'effet du couplage polymère-anti-inflammatoire (P-I) sur le modèle d'inflammation par instillation de TNBS pendant 5 jours par rapport au polymère seul, à l'immunosuppresseur seul, et au contrôle. Une troisième procédure concernant 60 animaux distribués en quatre groupes comme précédemment, consistera à évaluer l'effet protecteur du couple polymère-anti-inflammatoire sur le modèle de colite induite au DSS pendant 7 jours. Une quatrième procédure constituée d'un groupe de six animaux sera réalisée pour des expériences d'IRM itératives sans induction d'inflammation pendant 3 jours. Tous les animaux seront suivis quotidiennement et euthanasiés en fin de procédure.

Au total, l'ensemble des procédures concernera 156 animaux.

Ce projet intègre l'application de la règle des 3 R l'expérimentation animale

- Remplacer : l'approche que nous proposons ne peut être réalisée *in vitro*. L'effet à la fois de protection muqueuse et anti inflammatoire nécessite un environnement physiopathologique complexe.

- Réduire : Le nombre d'animaux dans cette approche est calculé au plus juste basé sur nos résultats préliminaires précédemment obtenus. Le choix d'un seul polymère (natif ou chimiquement modifié) a été préalablement argumenté par des expériences de sécurité et d'efficacité. Le grade médical de ce polymère permet de réduire considérablement les expériences de tolérance et les deux concentrations prévues ont un rationnel physicochimique (nature gélifiante de l'hydrogel permettant une adhésion plus aisée dans le rectum). Le nombre d'animaux par groupe permet selon notre expertise dans ces deux approches de colite induites (TNBS et DSS) d'obtenir des résultats suffisamment homogènes pour générer des données statistiquement utilisables. Les tests statistiques non paramétriques seront adaptés à ce faible nombre de souris.

- Raffiner : L'anesthésie consistera en l'inhalation d'isoflurane durant toutes les procédures. Les souris seront surveillées quotidiennement (survie, poids corporel, saignement rectal et consistance des selles) et les mesures nécessaires à la prise en charge de la douleur (antalgiques buprénorphine en IP) seront adaptées en fonction de l'état des animaux. Les effets du TNBS et du DSS seront contrôlés quotidiennement par des pesées et une surveillance selon un score clinique standardisé. Ce score correspond à une grille d'évaluation permettant de prendre des mesures progressives en fonction de l'élévation du score (augmentation de la fréquence des observations, administration de solution saline pour lutter contre la déshydratation, administration d'anesthésiant pouvant être renouvelé toutes les 12h, euthanasie précoce).

Ainsi, les procédures pourront être atténuées voire suspendues en cas de mauvaise tolérance ou de souffrance des animaux : L'environnement des animaux sera enrichi afin de leur permettre d'avoir un comportement le plus naturel possible (cotons, maisons, cycle jour/nuit). L'expertise du laboratoire dans la colite au DSS permet d'optimiser le suivi des animaux et de mieux apprécier les points limites liés à ce traitement.

11442 Ce projet pédagogique est destiné à la formation des étudiants en master Traitement du Signal et de l'Information à une technique d'imagerie non invasive, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) dans le cadre de travaux pratiques. Cette formation constituera une initiation aux rudiments de la manipulation des souris, à leur anesthésie par inhalation d'isoflurane, et aux méthodes de suivi (monitoring physiologique) dédiées à la RMN. Le protocole d'imagerie sera réalisé sur des souris anesthésiées afin de limiter le stress et l'anxiété. Quatre souris par formation seront utilisées, pour enseigner les méthodes d'imagerie *in vivo* sur 2 scanners dédiés à la souris opérant à 7T et à 11,75T. Cette formation assurera le respect du bien-être animal et sera conduite en application du principe éthique des 3 R. Remplacement : l'objet de la formation étant d'initier les étudiants se spécialisant dans le traitement des images biomédicales à l'acquisition d'IRM anatomiques, physiologiques, fonctionnelles et métaboliques en conditions réelles, le modèle murin est incontournable. En ce qui concerne le principe de réduction, le nombre de souris sera restreint au minimum nécessaire pour la démonstration. Le raffinement concernera la réduction du stress par l'utilisation de l'anesthésie gazeuse et l'enrichissement environnemental. Les animaux seront hébergés dans des conditions adaptées à leurs besoins physiologiques (groupes sociaux, cycle jour-nuit, nourriture et boisson *ad libitum*). Les cages seront enrichies avec des rondins de bois à ronger, du coton pour la nidification, un refuge en plastique, et une roue fast-track avec igloo afin de diminuer les comportements agressifs, réduire l'ennui, et favoriser l'expression d'un maximum de comportements naturels différents (comportements sociaux, locomotion, élimination, marquage, repos, fabrication d'un nid, recherche de cachette...). Un délai d'acclimatation minimum de 10 jours à réception des souris et une habitude à l'expérimentateur seront assurés. Un total de 20 souris sur 5 ans sera utilisé dans ce projet.

11443 Le risque de mort subite chez les patients épileptiques (SUDEP) est trois fois plus élevé que chez les personnes saines. Une des voies de recherche pour inhiber les SUDEP réside dans le contrôle

de l'activité du nerf vague. Effectivement, une des hypothèses actuelles repose sur l'idée que la SUDEP surviendrait suite à une intense activité neuronale qui se propagerait le long du nerf vague durant la crise d'épilepsie.

Récemment une étude a montré comment il était possible de modéliser expérimentalement la cascade d'événements de la zone épileptique jusqu'au tronc cérébral, avec un arrêt respiratoire, comme décrits dans les SUDEP. Néanmoins les activités vagale, cardiaque et respiratoire n'ont jamais été évaluées dans ce modèle. Notre projet vise à reproduire cette modélisation expérimentale en y ajoutant les trois mesures manquantes précédemment mentionnées. Cela nous permettrait de confirmer l'existence d'une activité paroxystique dans le nerf vague lors d'une crise d'épilepsie fatale.

Notre projet nécessite une intervention chirurgicale sous anesthésie générale permettant la mise en place d'électrodes et de capteurs qui mesureront les activités cardiaque, respiratoire, électroencéphalographique et vagale chez le rat. Ensuite, une injection de 4AP (molécule convulsivante) sera appliquée sous anesthésie afin de déclencher une crise d'épilepsie suivie d'un arrêt respiratoire. Durant cette crise, nous enregistrerons les paramètres présentés auparavant.

Nous expérimenterons 10-40 rats sachant que notre objectif vise à constituer une cohorte de 10 rats monitorés. Nous nous arrêterons d'expérimenter dès lors que nous atteindrons cet objectif de 10 rats. Et nous n'irons pas au-delà de 40 rats.

Concernant la règle Remplacement-Réduction-Raffinement, il n'est pas envisageable d'utiliser une approche *in vitro* ou *in silico* en remplacement de l'approche *in vivo* puisque le trait évalué correspond à la réponse mettant en jeu tout un processus physiologique intégré chez un animal vigile. Le choix du rat comme modèle expérimental est ici privilégié pour s'approcher au plus près des travaux déjà réalisés, tant au niveau des résultats que des méthodes. Notre objectif qui vise à observer une décharge vagale paroxystique qui s'inscrit dans un critère qualitatif et non quantitatif, ne nécessite pas une étude par comparaison de groupes traités-témoins avec de gros effectifs mais au contraire une approche minimaliste en terme de tailles d'échantillons. Cette approche nous permet de réduire le nombre d'animaux utilisés et de raffiner notre protocole dans le but de limiter le taux de perte, de minimiser le stress et la souffrance chez l'animal en veillant particulièrement au maintien des animaux dans un environnement enrichi. De plus, des points limites sont définies pour éviter toute souffrance potentielle. Enfin, des procédures de contrôle standardisées se traduisant par l'inspection des cages, les relèves de la température et de l'hygrométrie, seront réalisées quotidiennement en veillant au respect des normes et directives relatives au bien-être et à l'élevage d'animaux de laboratoires.

11444 L'objectif du projet est d'évaluer, chez la souris, les réponses immunitaires stimulées par un vaccin ADN contre le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) induit par le virus de l'immunodéficience féline (FIV) chez les chats infectés. Ce vaccin à base d'un acide nucléique ADN est un plasmide portant le génome du FIV rendu déficient pour la répllication par délétion du gène de l'intégrase du virus. De plus les séquences répétées terminales (LTR) du FIV portant les promoteurs ont été remplacées par les LTRs du lentivirus de la chèvre (virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre) CAEV. L'injection de cet ADN permettrait l'expression constitutive des antigènes du FIV qui vont induire des réponses immunes pouvant protéger efficacement contre le FIV pathogénique.

Dans le cadre de cette expérimentation nous utiliserons 56 souris BALB/c qui seront répartis en 3 groupes de 16 animaux et un groupe contrôle de 8 souris. A l'heure actuelle, il n'existe pas de système *ex vivo* ou *in vitro* permettant d'évaluer les réponses immunes cellulaires dirigées contre des antigènes. Le modèle murin est le petit animal le plus adéquat pour l'évaluation de l'antigénémie et remplace dans un premier temps l'utilisation des chats. L'utilisation de groupes de 8 souris par condition permet d'obtenir des résultats statistiquement fiables même en cas de réduction accidentelle d'un animal de l'effectif initial et ce, sans être obligé de recommencer l'expérimentation (Réduction). La méthodologie et les techniques utilisées ont déjà été employées avec succès pour d'autres prototypes vaccins similaires (Raffinement) : la douleur de l'immunisation par injection intramusculaire est légère (comparable à celle appliquée chez l'homme) et ne nécessite pas d'anesthésie préalable, le processus inflammatoire au point d'injection reste limité étant donné

l'absence d'adjuvant, aucune ulcération n'est observée suite à la vaccination ADN, le prélèvement sanguin unique est réalisé en toute fin de procédure sur les animaux profondément anesthésiés. L'entretien des animaux et l'observation de leur état sanitaire sont réalisés quotidiennement par le personnel qualifié.

11445 Les complications liées à l'athérosclérose telles que l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la principale cause de mortalité dans le monde. Malgré l'arsenal thérapeutique mis à disposition et les progrès majeurs faits au cours de ces dernières années, la prévalence de ces pathologies ne diminue pas. Jusqu'à très récemment, la prévention s'est focalisée sur la prise en charge des facteurs de risque classiques tels que l'hypertension artérielle, le diabète et l'hypercholestérolémie et en négligeant d'autres facteurs de comorbidités comme la santé bucco-dentaire. Dans ce contexte, une étude clinique publiée récemment a montré que la présence d'une maladie parodontale (le parodonte étant le tissu de soutien des dents) sévère chez des patients présentant un AVC augmentent la survenue d'évènements vasculaires secondaires et la mortalité, et ceci même après ajustements des facteurs de risque confondants.

La maladie parodontale est une pathologie infectieuse chronique qui affecte plus de 80 % de la population âgée de plus de 65 ans. Elle se caractérise par une inflammation et une perte de l'attachement de la gencive autour de la dent ce qui aboutit à la formation d'une poche dans laquelle se niche les pathogènes parodontaux.

De nombreuses études précliniques et cliniques ont pu mettre en évidence le lien entre maladie parodontale et AVC, cependant aucun lien causal n'a pu être démontré. Alors que les mécanismes d'action restent méconnus, il est accepté de façon consensuelle que les germes parodontaux et en particulier *Porphyromonas gingivalis*, la principale bactérie parodontale, peuvent passer dans la circulation sanguine. Cette bactériémie est silencieuse, transitoire et se produit de façon itérative principalement au cours des traitements bucco-dentaires mais aussi lors des phénomènes de mastication.

La mise en place de ce projet chez la souris pourrait à moyens et longs termes permettre la mise en place de nouvelles recommandations visant à améliorer la prise en charge de la maladie parodontale chez les patients qui ont un AVC et plus largement chez les patients à haut risque cardiovasculaire. Pour valider notre hypothèse, nous devons utiliser des modèles expérimentaux chez l'animal car c'est le seul moyen à l'heure actuelle pour étudier les différents aspects de notre projet.

Le but de ce projet est d'évaluer : i) l'impact de *Porphyromonas gingivalis* sur l'aggravation des dommages tissulaires lors d'un AVC via son effet sur la rupture de la barrière hémato-encéphalique (vaisseaux cérébraux imperméables qui sépare le tissu cérébral de la circulation sanguine) ou la réponse inflammatoire et ii) l'effet potentiellement bénéfique du traitement parodontal (mimé ici par un arrêt de la bactériémie) sur la récupération du cerveau post-AVC.

Ce projet qui va se dérouler pendant 2 ans, fait appel à l'utilisation d'un modèle ischémie reperfusion cérébrale ou AVC chez la souris. Pour cela, après anesthésie, nous introduirons un monofilament en nylon dans l'artère cérébrale moyenne de façon transitoire pendant 1 heure. Afin de mimer le passage des bactéries dans la circulation sanguine comme chez l'homme, nous injecterons par voie intraveineuse les bactéries 5 minutes avant le retrait du monofilament. Les animaux seront maintenus en vie jusqu'à 1 mois après l'induction de l'AVC, les animaux seront euthanasiés afin de récupérer le sang et le cerveau.

Afin de minimiser l'utilisation du nombre d'animaux, quand cela est possible, nous utiliserons des modèles *in vitro* à partir de culture cellulaire (par exemple pour l'étude de la barrière hématoencéphalique) et une étude statistique a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires, de 160 dans cette étude.

Les animaux seront surveillés quotidiennement et, des mesures visant à améliorer le bien-être (enrichissement) seront prises. Si des signes de douleurs venaient à apparaître alors des mesures visant à réduire la douleur (analgésie) seront prises avant, pendant et après les expériences. L'apparition de points limites entraînera l'euthanasie des animaux.

11446 L'obésité s'accompagne d'un état inflammatoire chronique systémique et tissulaire. Cet état inflammatoire est impliqué dans le développement de complications associées à l'obésité telles que les maladies cardio-vasculaires, le diabète mais aussi certains types de cancer (ex. les cancers du sein). La vitamine D ou 1,25-dihydroxy-vitamine D, la forme biologiquement active de la vitamine D, pourrait être utilisée comme agent thérapeutique pour le traitement de certains cancers. En effet, de nombreuses études ont montré que l'activité hormonale de la Vitamine D en se liant à son récepteur entraîne des effets anti-tumoraux par son rôle à la fois anti-inflammatoire, anti-prolifératif, entraînant également un arrêt de l'invasion et de l'angiogenèse dans divers types de cellules cancéreuses. De plus, des données précliniques chez l'homme montrent que des taux sériques bas de la vitamine D sont associés à un mauvais pronostic dans certains cancers.

L'objectif du projet est de réaliser une preuve de principe chez la souris de l'utilisation potentielle de la vitamine D dans le traitement de cancers (en condition obèse ou non).

Pour cela, une étude pharmacocinétique de la vitamine D sera réalisée *in vivo*. Puis, l'effet de la vitamine D sera évalué sur l'inflammation/obésité et croissance tumorale (mammaire et mélanome).

Pour cela, il est nécessaire de réaliser des greffes orthotopiques de tumeurs chez la souris, qui sur le plan physiopathologique, présentent des caractéristiques, non pas identiques, mais similaires à celles d'une tumeur humaine, avec une complexité tissulaire impossible à reproduire *in vitro*. Nous utiliserons un nombre minimum mais nécessaire de souris, évalué à un total de 232. L'hébergement des animaux se fera en confinement adapté en cages individuellement ventilées à raison de 4 souris par cage. La nourriture et l'eau seront fournies *ad libitum*. L'environnement sera enrichi par ajout de coton et de copeaux compressés utiles à la nidification. Dans le souci du respect du bien-être animal, les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne permettant de s'assurer des conditions adéquates de stabulation et de l'état de santé des animaux.

Nous mettrons en œuvre des procédures respectant au mieux les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Outre l'anesthésie durant la chirurgie, nous réaliserons une analgésie péroopératoire afin d'éviter la douleur. Dans un souci de raffinement et de réduction, le suivi de la croissance tumorale se fera de façon précoce, par des mesures cinétiques utilisant l'imagerie optique *in vivo* par bioluminescence (non invasive) sous anesthésie gazeuse (Vetflurane). Cette technologie très sensible permettra également de détecter précocement d'éventuelles métastases et donc d'évaluer l'effet de la vitamine D sur ce processus.

11447 Nous formons des étudiants au métier de technicien agronome. Des enseignements de production animale leur sont dispensés et ceux-ci consistent notamment en la description des méthodes permettant la maîtrise de la reproduction des mammifères.

Dans ce contexte, nous appliquons jusqu'alors ces connaissances en réalisant des travaux pratiques de redérivation de lignée murine, impliquant notamment des actes chirurgicaux (vasectomie des mâles). Dans un souci de raffinement, nous souhaitons limiter ce type d'acte invasif et allons, grâce à ce nouveau projet, remplacer ces manipulations par la réalisation de prélèvements de gamètes et de Fécondation *In vitro*. Nous aurons hélas toujours recours à l'animal, pour collecter les gamètes, mais nous nous limiterons à un prélèvement post-mortem pour ce faire et réduirons le nombre d'animaux manipulés au strict minimum.

Au préalable, les étudiants auront progressivement appris à manipuler, anesthésier, prendre soin des animaux en expérimentation, grâce au suivi d'une formation à l'expérimentation animale de niveau A, préparée en parallèle de leur diplôme.

Durant une première séance de TP, les étudiants seront préalablement entraînés aux prélèvements de gonades sur support non vivant (cadavres d'animaux décongelés, récupérés de laboratoires de recherche) et après visionnage de vidéos.

En vue de la seconde séance de TP, 24 souris femelles seront traitées pour une superovulation, via 2 injections intrapéritonéales d'hormones. Ces injections seront réalisées par les techniciens de l'animalerie ou par l'enseignant. En début de séance de TP, ces souris femelles seront euthanasiées dans une zone au calme. Des prélèvements d'oviductes seront alors réalisés par les étudiants pour

en extraire les gamètes puis des FIV seront réalisées et le développement des embryons obtenus sera suivi pendant trois jours avant congélation (stades préimplantatoires).

La dernière séance de TP consistera à un entraînement de réimplantation intra-utérine des embryons décongelés sur support non-vivant (cadavres de souris décongelés, récupérées de laboratoires de recherche).

Ces travaux pratiques seront par ailleurs réalisés en effectif réduit, sous la tutelle d'enseignants expérimentés portant grande attention au bien-être de l'animal.

Pour une promotion de 48 étudiants, 24 souris femelles seront utilisées. Ceci correspond à un animal par binôme, ce qui nous semble nécessaire à un bon apprentissage.

Le bien-être des animaux sera évalué tout au long des procédures, une analgésie adaptée sera mise en place si nécessaire et des points limites auront été définis à l'avance.

11448 Notre laboratoire s'intéresse à la virulence de certaines espèces bactériennes. Notre projet porte plus particulièrement sur une espèce bactérienne à l'origine d'infections invasives chez le nouveau-né (pneumonie, septicémie et dans les cas les plus graves, méningite). Nous étudions plus particulièrement la capacité de cette bactérie à franchir les barrières physiologiques cérébrales, une étape fondamentale qui permet de comprendre le développement de la méningite. L'infection commence par une septicémie, puis les bactéries présentes dans le sang, passent du sang vers les méninges, permettant ainsi le développement de la méningite. Notre projet de recherche vise à comprendre cette étape clé de la physiopathologie. Nous recherchons les acteurs moléculaires impliqués dans cette étape tant au niveau bactérien (protéines de surfaces exprimées par la bactérie) qu'au niveau de la cellule hôte (récepteurs cellulaires permettant l'adhésion des bactéries). Ce projet est un projet de recherche fondamentale mais l'identification des acteurs microbiens et cellulaire pourrait avoir des retombées appliquées permettant le développement de nouvelles stratégies anti-infectieuses innovantes ou la définition de biomarqueurs de risque.

L'utilisation de lignées cellulaires en culture nous permet de caractériser un certain nombre d'étapes mais ne récapitule pas entièrement le processus physiopathologique. Par ailleurs, le franchissement des barrières cérébrales peut s'effectuer à différents sites anatomiques dans le cerveau pour lesquels il n'existe pas de modèle de culture cellulaire approprié. Ceci implique l'utilisation d'animaux qui nous permettra de :

- Confirmer *in vivo* ce qui a été montré *in vitro*
- Identifier des cibles ne pouvant être explorées *in vitro* faute de modèles cellulaires adéquats
- Avoir une vue d'ensemble du processus physiopathologique tel que l'implication du système immunitaire, du complément...) qui ne peuvent être appréhendés dans des modèles *in vitro*.

Le modèle animal souris reproduit au mieux les caractéristiques du processus infectieux chez l'homme (colonisation des voies respiratoires, colonisation digestive, bactériémie, septicémie et méningite). Notre projet consiste donc à injecter des bactéries aux souris et à suivre i) le devenir de ces bactéries *in vivo* et ii) les conséquences de l'infection chez l'animal.

Durant le temps des expériences que nous mènerons chez la souris, les souris seront suivies quotidiennement et des mesures seront prises afin de réduire la douleur si elle est détectée. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au nombre minimum nécessaire et suffisant pour permettre l'analyse statistique des données. Au total 1677 souris seront utilisées.

Nous avons raffiné la méthodologie par l'introduction de points limites qui ont été validés avec la structure locale chargée du bien-être animal, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures (classées de sans réveil à modérée selon les procédures) se dérouleront avec une surveillance journalière et des anesthésies et/ou antalgiques sont prévus en cas de nécessité.

Par exemple, dans un esprit de raffinement la délivrance d'un antibiotique durant le temps de certaines expériences sera réalisée grâce à la technologie innovante de comprimés sous cutanés, qui s'effectuera à l'aide d'un trocart sous brève anesthésie générale ainsi qu'une d'une analgésie.

Cette technique devrait permettre d'éviter la pose d'une pompe osmotique, qui nécessite une chirurgie et qui est beaucoup plus douloureuse et stressant pour l'animal.

La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est un enjeu majeur de santé publique. Notre projet, permettra une meilleure compréhension de la physiopathologie des méningites néonatales. Ceci pourrait permettre à terme le développement de nouvelles thérapeutiques anti-infectieuses innovantes.

11449 Les leucémies sont les cancers les plus fréquents chez l'enfant et les plus agressives sont les leucémies aigües qui affectent les cellules responsables du renouvellement complet du sang. Parmi elles, les leucémies aigües myéloïdes (LAM) détiennent un taux de survie des plus bas, avec 60 à 65% de survie à 5 ans malgré des chimiothérapies intensives. Ces dernières utilisées pour traiter les LAM comprennent des molécules anciennes incluant les anthracyclines, une classe de médicament efficace dans ces pathologies mais qui possède une toxicité cardiaque importante. Ainsi, des approches visant à améliorer la distribution des anthracyclines ont alors vu le jour.

Nous nous situons dans ce contexte d'amélioration de la distribution et avons identifié un vecteur, c'est-à-dire un moyen de transporter un principe actif, qui cible préférentiellement les globules blancs du sang dont font partie les cellules pathologiques provoquant les LAM. Nous avons couplé ce vecteur protéique à un marqueur fluorescent pour suivre sa distribution dans les cellules et l'avons déjà testé et validé dans plusieurs modèles cellulaires *in vitro*. En effet, nous avons pu identifier dans quelles cellules parmi les globules blanc le vecteur est capable de rentrer. Nous avons aussi pu déterminer qu'il rentre dans des cellules myéloïdes leucémiques et qu'il n'est pas toxique sans principe actif.

Notre but est maintenant d'évaluer sa distribution dans le sang et la moelle lorsqu'il est injecté *in vivo*. Cela permettra d'apprécier le ciblage de ces mêmes types cellulaires déjà identifiés *in vitro* et la possibilité d'en développer un vecteur thérapeutique. Dans ce cadre, les souris immunocompétentes représentent un modèle classique des plus proche de l'homme pour apprécier la distribution du vecteur. Nous réaliserons des injections intraveineuses car l'application thérapeutique est la LAM.

Ce projet nécessite l'utilisation de 24 souris. Il a été conçu dans le respect de la règle des 3 Rs. En effet, nous en sommes à une étape où les modèles animaux ne peuvent être Remplacés par des expériences *in vitro* ; nous avons Réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats fiables et enfin, en termes de Raffinement, les souris seront maintenues dans des cages de 6, avec un environnement enrichi. Les procédures expérimentales ne nécessitent pas d'anesthésies ni d'analgésies car l'innocuité du vecteur a déjà été décrite et dans cette étude il ne sera pas combiné à de la chimiothérapie.

11450 L'épilepsie du lobe temporal (TLE) est la forme la plus fréquente et la plus grave chez l'adulte. Elle représente les deux tiers des épilepsies partielles, chez les adolescents et les adultes. Le foyer principal des crises épileptiques dans la TLE se localise dans l'hippocampe. Dans ce noyau cérébral, les crises sont l'expression d'un fonctionnement anormal, aigu et transitoire de l'activité électrique des neurones appelés cellules granulaires du Gyrus Dentelé. La suractivité synchronisée de ces neurones résulte de la formation de connexions (synapses) excitatrices récurrentes aberrantes, formant ainsi une boucle d'excitation sur ces cellules elles-mêmes. Le récepteur GluK2 (récepteur kainate au glutamate composé de la sous-unité GluK2) est anormalement exprimé, dans ces neurones, au niveau des synapses aberrantes. Chez les souris transgéniques n'exprimant pas le récepteur GluK2, la fréquence et l'amplitude des crises d'épilepsie induites chimiquement sont très significativement diminuées voire totalement supprimées.

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

GluK2 seront apportés par des vecteurs viraux communément utilisée en thérapie génique humaine.

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

Ce projet respecte la règle des 3R. Pour le R de remplacer, le choix et la validation des ARN interférents ont été réalisés sur des modèles *in vitro*. Maintenant, cette étude préclinique nécessite le recours au modèle animal pour évaluer la délivrance des ARN interférents *in vivo*. Pour le R de réduire, nous limitons les groupes expérimentaux au minimum nécessaire pour réaliser des analyses statistiques robustes, soit 10 animaux maximum par groupe. Pour le R de raffiner, toutes les procédures seront réalisées par une personne formée et ont été optimisées pour soulager le stress et la douleur des animaux tout au long de cette étude. Ainsi la chirurgie stéréotaxique est réalisée sous anesthésie générale avec contrôle de la température corporelle ; une couverture antalgique permettra une limitation de la douleur pendant et après le réveil de l'animal. Les animaux seront surveillés quotidiennement en post-chirurgie. Des points limites sont définis et décrits dans les procédures, pour éviter la souffrance des animaux. De plus, un enrichissement des cages constitué de maisons en papier mâché sera utilisé pour permettre aux animaux de se cacher et d'établir des liens sociaux entre eux.

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

11451 Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant et l'adulte jeune. Les gliomes malins infiltrant du tronc cérébral (ou DIPG), qui représentent 10 à 15% des tumeurs cérébrales pédiatriques, sont les formes les plus graves et les plus mal connues sur le plan biologique. Ces tumeurs sont inopérables en raison de leur nature infiltrante et de leur localisation profonde dans le tronc cérébral. Elles sont chimiorésistantes et la radiothérapie, traitement standard, n'est efficace que transitoirement. En cela, ces tumeurs sont universellement incurables et constituent le plus grand défi thérapeutique de l'oncologie pédiatrique à ce jour. Actuellement, peu de modèles d'étude de cette maladie sont disponibles et l'exploration de l'activité de nouvelles thérapeutiques reste encore très limitée. Nous avons récemment réussi à développer des modèles de xénogreffes à partir de lignées de cellules souches cancéreuses établies à partir de prélèvements tumoraux de patients atteints de DIPG. Ces tumeurs, modifiées *in vitro*, sont bioluminescentes et peuvent être suivies au cours du temps par imagerie limitant ainsi le nombre d'animaux employés dans l'étude. Une voie de signalisation cellulaire (AKT/PI3K/mTOR) est modifiée dans de nombreuses tumeurs gliales en pédiatrie, environ 50% des DIPG présentent des mutations dans cette voie. L'inhibition de cette voie peut donc être une cible thérapeutique intéressante afin de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique. L'ipatasertib est une molécule capable d'inhiber spécifiquement la protéine AKT. Des études précliniques ont montré un effet antitumoral important dans les tumeurs surexprimant AKT. Nous avons confirmé cet effet *in vitro* sur des lignées primaires de cellules dérivées de DIPG.

Il est indispensable à présent d'évaluer l'effet de l'ipatasertib sur des xénogreffes *in vivo*, seule possibilité de représenter un organisme entier (pharmacocinétique, toxicité, ...), avant de pouvoir soutenir l'introduction du médicament en clinique. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'activité antitumorale *in vivo* de la molécule anticancéreuse nommée ipatasertib.

Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Les procédures seront réalisées sous anesthésie gazeuse et une analgésie sera pratiquée en post-opératoire et dès l'apparition d'au moins un signe clinique pour éviter toute souffrance. Les points limites seront strictement appliqués. Les animaux seront hébergés en groupe et le milieu sera enrichi. Les animaux auront un examen clinique et une pesée quotidiens. L'ensemble de ce projet comprend l'utilisation d'au maximum 185 souris. Toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale pour limiter la douleur et le stress des animaux.

11452 Ce projet a pour objectif de permettre à nos clients d'étudier l'efficacité de produits vétérinaires chez sur le chien. Le produit testé peut être un vaccin ou tout autre produit destiné à traiter un chien.

Pour le développement d'un produit vétérinaire, les différentes formulations candidates doivent être comparées entre elles afin de déterminer celle qui est la plus efficace pour le traitement de l'animal.

Chaque test sera réalisé comme suit : pour chaque formulation, 5 à 30 chiens seront traités à la posologie recommandée par le fabricant, et les volumes administrés ne dépasseront pas les recommandations. Un groupe d'animaux non traité pourra être inclus pour servir de témoin.

Aucune réaction sévère n'est attendue, mais dans le cas de symptômes cliniques importants, sur avis vétérinaire, l'animal pourra être exclu du test avant la fin et si besoin un traitement adapté sera mis en place.

L'efficacité de la vaccination ou du traitement sera évaluée grâce à des prélèvements sanguins, ou tout autre prélèvement non invasif. La fréquence et le volume des prélèvements seront déterminés en fonction du respect du bien-être et de la santé des animaux, et respecteront les recommandations.

L'efficacité du produit pourra également être évaluée par des examens cliniques pouvant inclure des mesures physiologiques non invasives telles que la température rectale.

L'estimation du nombre d'animaux requis pour ce projet sur 5 années est de 750 chiens.

L'utilisation de chiens sur ce projet est justifiée par le fait qu'ils représentent l'espèce cible du produit et qu'il n'existe pas de méthode de remplacement pour ce type de test.

11453 L'hémophilie est une maladie génétique, grave et invalidante, caractérisée par d'importantes hémorragies, conséquence d'un retard de la coagulation sanguine. Elle est causée par la déficience en facteurs dit « anti-hémophiliques », sans lesquels la coagulation est impossible.

Actuellement, le traitement consiste en l'injection répétée du facteur de la coagulation manquant au malade. Deux principales stratégies sont alors menées pour améliorer le traitement : (1) l'augmentation de la performance des facteurs anti-hémophiliques injectés (demi-vie, activité coagulante) et (2) la thérapie génique visant à restaurer de manière permanente l'activité de production protéique. Parallèlement, de nouveaux concepts visent à influencer, à l'aide de séquences d'acides nucléiques, sur l'équilibre entre les facteurs initiateurs et inhibiteurs de la coagulation sanguine : inactiver les inhibiteurs de la coagulation.

L'objectif de ce projet est d'étudier sur deux modèles de souris hémophiles, l'expression de différents matériels nucléiques codant pour des protéines d'intérêt thérapeutique pour la coagulation ou visant à modifier son équilibre. Le matériel nucléique sera injecté dans la veine caudale de l'animal préalablement anesthésié. Des prélèvements de sang seront effectués soit par voie intracardiaque soit par voie rétro-orbitaire sur l'animal endormi pour évaluer la capacité coagulante de la protéine générée.

Habituellement, ces acides nucléiques sont apportés à la cellule par le biais de vecteurs (viraux pour la plupart) mais peuvent être intégrés dans les cellules sous la forme de molécules nues.

Le protocole faisant l'objet de la demande est basé sur des résultats très récents obtenus lors d'une phase pilote que nous avons menée pendant un an et validée auprès du comité d'éthique. Cette étude a permis de déterminer les conditions optimales de bien-être des souris hémophiles lors d'une injection de matériel génétique nu, par voie intraveineuse et d'apprécier les conséquences sur la coagulation sanguine.

Cette étape de mise au point de la technique a servi à démontrer la capacité des souris dites hémophiles à supporter l'injection en respectant la règle des 3R. En effet, la technique est à l'origine de troubles cardiorespiratoires d'installation rapide mais tout aussi rapidement et spontanément résolutifs. D'après des données de la littérature, le protocole ne préconisait pas de traitement antalgique, anesthésique ni de prise en charge de l'arythmie cardiaque et de ses conséquences sur les fonctions respiratoires. Dans notre étude pilote, nous avons eu le souci d'évaluer le bénéfice de traitements antalgiques, analeptiques sur le bien-être de l'animal. Lors de notre phase pilote, nous avons mis au point un protocole qui permet à la souris (1) d'être anesthésiée durant l'injection, (2) de mieux récupérer des dysfonctionnements respiratoires et (3) d'exprimer et de tolérer les protéines de la coagulation issues du matériel génétique injecté.

Il est important de préciser que la souris hémophile, paradoxalement à la forme humaine de cette altération génétique, ne présente aucun phénotype dommageable. Elle n'est donc pas victime de saignement spontané et tout saignement provoqué est résolutif et ce, sans prise en charge. Si la souris hémophile, A ou B, a des résultats biologiques comparables concernant les taux de facteurs de la coagulation, elle n'est donc pas atteinte de la même sévérité phénotypique et toutes les manipulations effectuées sur les souris normales peuvent être transposées à la souris hémophile.

Afin d'obtenir des résultats les plus fiables possibles, ce projet répond aux mieux aux critères de remplacement, de réduction et de raffinement :

- 1) Remplacement : La nécessité d'un modèle animal est justifiée par le fait qu'un modèle vivant, dynamique et doté d'un système vasculaire est nécessaire pour des études sur la coagulation sanguine. La souris est un modèle approuvé, fiable, des lignées hémophiles A et B sont disponibles
- 2) Réduction : le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit à son minimum sans compromettre la significativité statistique de l'expérimentation
- 3) Raffinement : toutes les mesures seront prises pour veiller au bien-être de l'animal. Les conditions de l'élevage, de l'hébergement, des soins et des méthodes utilisées pour chaque étape de l'expérimentation se feront sous condition de minimiser douleurs, souffrance, angoisse et dommages durables que pourraient ressentir l'animal.

Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal et à l'observation des signes cliniques fondamentaux, notamment dans le domaine de la coagulation. Toutes les personnes intervenant dans ce projet auront été préalablement formées au protocole d'injection hydrodynamique.

Le matériel nucléaire utilisé correspondra à des plasmides comprenant l'ADN codant pour le facteur VIII et facteur IX de la coagulation, utilisés dans le laboratoire depuis plus de 15 ans. Ce matériel nucléaire nu ne comprendra pas de séquence capable d'être intégrée au génome de l'animal. Ce type d'insert n'induit ni pathologie, ni caractéristiques génétiques nouvelles chez les modèles, qu'elles soient transmissibles à la descendance ou non. L'injection de matériel nucléaire nu chez le rongeur ne doit donc pas être considérée comme génératrice d'individus génétiquement modifiés puisque l'expression de ces séquences ne sera que transitoire estimée d'une à deux semaines.

Le reste du matériel se dissémine dans la circulation mais sera rapidement dégradé par les nucléases sanguines. Le matériel génétique utilisé dans ce projet est donc du groupe I. Suite au traitement, il ne sera donc pas nécessaire de prévoir de conditions de confinement particulières pour les souris.

Selon les données antérieures issues de nos collaborations sur ce projet, nous estimons le nombre d'individus à 24 par modèle (modèle hémophile A : 24 ; modèle hémophile B : 24) donc 48 la première année pour l'identification des séquences plasmidiques intéressantes. Pour une durée totale de 5 ans, il sera nécessaire d'utiliser $24 \times 2 \times 5 = 240$ souris.

- 11454** La maladie d'Alzheimer est la plus fréquente des maladies neurodégénératives (65% des cas de démence, 900 000 personnes atteintes en France). Elle est caractérisée par une évolution lente mais progressive de l'atteinte neuronale affectant les capacités de mémorisation et de cognition des patients réduisant progressivement leur autonomie. Cette pathologie complexe est liée à un dysfonctionnement des connexions entre neurones (synapses) qui aboutit à la dégénérescence

des neurones de l'hippocampe (structure impliquée dans la mémoire) puis de l'ensemble du cerveau. Les patients doivent endurer une perte irréversible de leurs fonctions cognitives puisqu'à l'heure actuelle, aucun traitement ne permet de stopper l'évolution de la pathologie. La compréhension des mécanismes mis en oeuvre précocément et conduisant à cette neurodégénérescence représente donc un défi majeur afin de développer des thérapeutiques innovantes.

Avant même l'apparition des premiers symptômes, les neurones sont affectés par des dysfonctionnements liés à la présence de protéines anormales. Parmi ces protéines, on trouve le peptide bêta-amyloïde dont l'accumulation conduit à la formation de plaques amyloïdes ou plaques séniles. Ces protéines sont présentes très tôt dans le cerveau, dès les stades asymptomatiques, c'est à dire bien avant la dégénérescence des neurones. Ce sont ces stades qui nous intéressent et notre objectif est de comprendre quels sont les mécanismes à l'origine de la toxicité du peptide bêta-amyloïde et de la mort neuronale. Pour cela, nous étudions le fonctionnement des synapses et nous nous intéressons notamment à un partenaire essentiel de la synapse : l'astrocyte. En effet, l'astrocyte envoie des prolongements au coeur de la synapse et il participe activement à maintenir la structure de la synapse tout en modulant la communication entre les neurones. Ce garant structurel et fonctionnel de l'intégrité des synapses semble jouer un rôle de première ligne dans la protection mais également dans la mise en place des phénomènes de toxicité synaptique.

Nous avons précédemment mis en évidence que le peptide bêta-amyloïde a un impact très précoce sur le fonctionnement de l'astrocyte avec des conséquences délétères sur les synapses qu'il entoure au sein de l'hippocampe de souris. L'hippocampe est une structure essentielle dans la mémorisation et est la première affectée par les dysfonctions liées à la présence du peptide bêta-amyloïde. Nous avons identifié un acteur astrocytaire impliqué dans la toxicité précoce du peptide bêta amyloïde et nous disposons d'une substance pharmacologique permettant de reverser les effets cellulaires de cette toxicité. Dans ce projet, nous souhaitons traiter des souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer avec cette substance afin d'étudier les effets à court, moyen et long terme sur la progression de la pathologie et l'apparition des troubles de mémoire caractéristiques. Cette substance a déjà été utilisée dans d'autres études scientifiques (notamment dans des modèles de douleurs neuropathiques) et n'est pas toxique pour l'animal.

Remplacement - Notre approche méthodologique permet d'avoir accès aux interactions neurones-astrocytes dans un environnement physiologique préservé qui maintient l'intégrité fonctionnelle des réseaux hippocampaux et l'intégrité des communications cellulaires au sein de ces réseaux. Ce modèle ne peut être remplacé par des modèles de culture cellulaire car les interactions neurones-astrocytes sont limitées en culture et les fonctions astrocytaires sont restreintes à un soutien métabolique qui ne reflète pas la complexité de leurs fonctions *in vivo*. De plus, nous souhaitons étudier les effets à long terme de cette substance, par des tests comportementaux permettant d'évaluer les fonctions de mémoire chez l'animal. Dans ce contexte, la souris apparait comme le modèle de choix pour ce projet compte-tenu de la similarité moléculaire, cellulaire et fonctionnelle des circuits impliqués dans les processus mnésiques. Ce choix du modèle souris est également justifié par le fait que nous utiliserons des souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer. Ces souris transgéniques développent des plaques amyloïdes au niveau du cerveau et manifestent les mêmes troubles touchant la mémoire et la cognition que l'homme.

Raffinement - La procédure d'injection utilisée induit une douleur légère chez l'animal. Si une souffrance liée à la répétition des injections est mise en évidence, les animaux seront exclus de l'étude. Nous serons particulièrement attentifs au bien-être animal et nous surveillerons les animaux quotidiennement.

Réduction - Nous testerons 4 lots d'animaux transgéniques et contrôles. Les analyses seront réalisées à 3 âges différents (1 mois, 3 mois et 8 mois) ce qui concerne au total 216 animaux sur 5 ans. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en garantissant la validité statistique des résultats obtenus.

11455 Le but de notre équipe est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies et dystrophies) et de tester l'éventuelle amélioration des signes de la maladie grâce à différentes approches thérapeutiques. Notre travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles. Pour comprendre comment les mutations génétiques sont responsables de ces pathologies, nous avons dans un premier temps utilisé des modèles cellulaires. Nous prévoyons maintenant d'utiliser des souris mimant la dystrophie myotonique de type 1 pour mieux comprendre les mécanismes responsables de la pathologie dans ce modèle vivant.

Nous avons précédemment montré qu'un niveau trop élevé de la dynamine 2 dans le muscle semblait jouer un rôle majeur dans la survenue de certaines myopathies. Nous avons développé une approche thérapeutique utilisant un composé injectable capable de diminuer le niveau de dynamine 2. Chez des souris malades injectées avec ce composé, nous avons obtenu leur rétablissement quasi-total sur l'ensemble des signes cliniques de la maladie, et l'allongement de leur durée de vie. Notre but est maintenant d'appliquer cette approche thérapeutique à d'autres maladies musculaires (dystrophies), plus particulièrement à la dystrophie myotonique de type 1.

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est la forme la plus commune de dystrophie musculaire chez les adultes, avec une incidence de 1 : 15000, se caractérisant notamment par une atteinte musculaire sévère et progressive, des défauts cardiaques et des déficits cognitifs. A ce jour, aucun traitement effectif n'a encore été développé pour cette maladie.

Les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris, et de mieux comprendre leur développement. Les souris seront analysées *in vivo*/ *in situ* / *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures (REPLACEMENT).

Plusieurs procédures expérimentales (maximum une par jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris/groupe seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Ainsi, un maximum de 4560 souris sera utilisé.

Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, les souris seront surveillées quotidiennement. Afin d'améliorer le bien-être animal tout au long de la vie de l'animal, les conditions d'élevage et d'hébergement seront optimisées par un enrichissement dans toutes les cages (ajout de matériel pour faire un nid), le regroupement des animaux de même sexe pour limiter la solitude et favoriser le comportement social. De la nourriture adaptée à ce modèle de souris sera utilisée. Lors de l'expérimentation, tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude, prématurément si nécessaire). Selon les expérimentations, plusieurs mesures seront prises pour maintenir le bien-être animal comme l'utilisation d'un tapis chauffant afin de maintenir la température corporelle des animaux et l'application de gel ophtalmique pour conserver une bonne humidification des yeux si la procédure expérimentale implique une anesthésie. Toujours en cas d'anesthésie, les animaux seront surveillés jusqu'à leur réveil complet puis suivis ensuite quotidiennement (RAFFINEMENT).

11456 Ce projet pédagogique est destiné à la formation du personnel de recherche à une technique d'imagerie non invasive permettant le suivi longitudinal des animaux. Il concernera toute personne, permanente ou stagiaire, qui doit utiliser des modèles animaux pour ses procédures expérimentales d'imagerie par résonance magnétique, lorsque ces personnes ne sont pas éligibles à la formation réglementaire d'expérimentateur-concepteur de niveau I. Cette formation constituera une initiation aux gestes basiques de manipulation des souris, à leur anesthésie par inhalation d'isoflurane, à l'administration de produits nécessaires pour les expériences (agents de contraste d'imagerie) par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, et aux méthodes de suivi (monitoring physiologique) dédiées à la RMN. Deux souris par formation seront utilisées, dont une sera euthanasiée pour enseigner la procédure réglementaire d'euthanasie sous anesthésie profonde, la dissection de l'animal pour faire correspondre son anatomie avec les images obtenues par IRM, et enfin le prélèvement d'organes. Cette formation assurera le respect du bien-être animal et l'application du principe éthique des 3 R,

dans des conditions d'hébergement adaptées aux besoins physiologiques de l'animal (en groupes sociaux, cycle jour-nuit, nourriture et boisson *ad libitum*) comme lors de leur manipulation (limitation du stress, anesthésie). Le raffinement concernera également l'enrichissement environnemental : les souris seront hébergées en groupes sociaux dans des cages contenant des rondins de bois à ronger, du coton pour la nidification, un refuge en plastique, et une roue fast-track avec igloo afin de diminuer les comportements agressifs et réduire l'ennui, et surtout de favoriser l'expression d'un maximum de comportements naturels différents (comportements sociaux, locomotion, élimination, marquage, repos, fabrication d'un nid, recherche de cachette...). En ce qui concerne le principe de réduction, le nombre de souris sera restreint au minimum nécessaire pour la démonstration. L'objet de la formation est d'enseigner les principes d'une méthode d'imagerie permettant de réduire le nombre d'animaux dans les projets. En effet, l'IRM est une méthode alternative permettant de raffiner les procédures (collecte d'un grand nombre de données sur un même animal en limitant le stress et la douleur) et de réduire le nombre d'animaux (suivi longitudinal des souris) cependant il n'existe pas d'alternative à la démonstration pratique sur la souris afin de remplacer l'utilisation d'animaux. Un délai d'acclimatation minimum de 10 jours à réception des souris et une habitude à l'expérimentateur seront assurés. Un total de 20 souris sera utilisé dans ce projet.

11457 En France, la libre circulation des espèces animales aquatiques doit être assurée et restaurée en application de la Loi sur l'Eau et les Milieux Aquatiques (LEMA). Certains ouvrages (barrages, seuils) prioritaires pour la restauration de la continuité écologique des cours d'eau ont été identifiés comme « ouvrages Grenelle » (loi grenelle II du 12/07/2010). L'une des espèces visées est en particulier le saumon atlantique, qui doit parcourir de très longues distances depuis l'océan pour accéder aux premières zones de reproduction. Cette espèce est menacée en raison notamment de la présence de nombreux obstacles à sa migration. Un de ces ouvrages a récemment fait l'objet de travaux d'aménagement, consistant à réduire la hauteur de chute, et mettre en place un dispositif de franchissement piscicole. Un suivi de l'efficacité des travaux a été imposé par arrêté préfectoral. Un protocole d'étude par télémétrie radio est envisagé, impliquant de capturer et de marquer des saumons pour suivre leurs déplacements tout au long de leur remontée. Le suivi a pour objectifs de mesurer la franchissabilité par les saumons de l'ouvrage aménagé, et d'évaluer le retard éventuel dans la migration pour franchir cet ouvrage par comparaison avec les suivis réalisés avant travaux, selon le même protocole de télémétrie radio. Le protocole ne peut pas être remplacé par une technique alternative moins invasive (comme le vidéo comptage), le suivi par marquage individuel étant indispensable pour mesurer précisément les déplacements.

Les poissons seront capturés à l'aide d'un piège localisé en aval de l'ouvrage étudié. Ce piège dispose d'une installation appropriée permettant de limiter au maximum la manipulation des poissons, jusqu'à leur relâcher. Les piégeages auront lieu de mars à juin 2019. Les saumons seront marqués à l'aide d'émetteurs radio implantés par voie intragastrique. Cette technique est réputée comme la moins traumatisante pour l'espèce qui ne se nourrit plus dès lors qu'elle pénètre dans les eaux continentales. Conformément aux décisions prises lors des Comités de Pilotage dédiés à l'élaboration du protocole de suivi, les saumons marqués devront permettre une acquisition et une exploitation maximale des données récoltables. Le suivi des déplacements des saumons sera réalisé par radiopistage pendant 6 mois. Sept stations fixes équipées de récepteur/enregistreur permettront de quadriller la zone d'étude. Ces installations seront complétées par des prospections mobiles pour s'assurer de ne perdre aucun individu marqué. La plupart des géniteurs vont mourir au moment de la reproduction ; toutefois, une minorité peut survivre et rejoindre la mer, dans ce cas les poissons peuvent recommencer à s'alimenter et l'émetteur peut être expulsé.

Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la question posée (règle des 3 R : Remplacement) ; en outre, il est indispensable d'avoir recourt à des poissons sauvages pour étudier leur comportement en milieu naturel. Un effectif de 30 saumons sera capturé, marqué et suivi. Il s'agit d'un minimum pour obtenir un échantillon représentatif des comportements migratoires au sein de la population et pour évaluer la variabilité intra populationnelle de ces comportements, tout en limitant au maximum les atteintes sur la population (Règle des 3R : Réduction). En cas d'effectifs migratoires trop faibles en 2019 pour atteindre l'objectif escompté, une campagne de marquage

complémentaire pourra être effectuée en 2020. Les animaux seront anesthésiés lors de l'opération de marquage, leurs constantes vitales seront surveillées et leur réveil post-marquage assuré avant de les relâcher dans le milieu naturel (règle des 3R : Raffinement). Les manipulations d'animaux seront réalisées par du personnel formé et habilité.

11458 Les maladies infectieuses sont responsables de plus de 17 millions de décès par an dans le monde. En France après une période de régression due à l'amélioration des conditions d'hygiène et de vaccination, on assiste à un retour de ces maladies et à l'apparition de résistances, faisant encore des maladies infectieuses la troisième cause de mortalité en France avec un impact sanitaire et économique majeur. Les bactéries sont à ce titre un agent pathogène majoritairement responsable de ces maladies, soit par leur simple présence au sein des tissus infectés et de la réponse immunitaire induite, soit par la production par ces microorganismes de facteurs de virulence et/ou toxines.

L'inflammation est un mécanisme qui permet à l'organisme de se défendre contre les infections microbiennes, mais qui dans certains cas peut entraîner des déficits immunitaires et des cancers. Une bonne connaissance des phénomènes de contrôle de cette inflammation est donc indispensable pour la protection de l'hôte contre les pathogènes.

Il a été montré récemment que, chez certaines bactéries pathogènes, coexistaient des facteurs de virulence permettant à la bactérie d'infecter l'hôte, et des facteurs d'« avirulence » induisant une réaction de défense de l'hôte contre ce pathogène. Ainsi certaines souches d'*Escherichia coli* responsables d'infections urinaires, sont capables de produire les deux facteurs Cnf1 et HlyA. Cnf1 va être reconnu par l'hôte qui va développer une réponse inflammatoire en vue de l'élimination du pathogène qui va lui-même développer une contre mesure, via HlyA, lui permettant de contrer la réponse de l'hôte. On a donc un modèle dans lequel HlyA est un facteur de virulence majeur qui protège le pathogène contre la réponse immunitaire induite par Cnf1.

Il a été montré par ailleurs que cette réponse antimicrobienne dépendait de la présence de récepteurs de l'hôte reconnus par des molécules de surface du pathogène. Cette reconnaissance entraîne la formation d'un complexe multiprotéique, appelé inflammasome qui gouverne cette réponse antimicrobienne pour aboutir à l'élimination de l'agent pathogène.

Le but de ce projet est de montrer le rôle de l'un de ces inflammasome, NLRP3, dans un modèle murin d'infection bactérienne. Pour cela des souris seront infectées par vie intra veineuse par différentes souches d'*Escherichia coli* (sauvage, ou ne possédant pas l'un ou l'autre, ou les deux facteurs Cnf1 et HlyA), et la quantité de bactéries présentes dans le sang sera suivie au cours du temps. Nous utiliserons des souris traitées ou non traitées par des inhibiteurs de NLRP3, ainsi que des souris ne possédant pas l'inflammasome NLRP3.

Une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans ces échanges entre l'hôte et le pathogène devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles pour de nouvelles applications thérapeutiques.

Pour ce projet, nous aurons besoin d'utiliser au maximum 864 souris. Dans un souci de remplacement, l'ensemble des expériences de mises en évidence ont été réalisées *in vitro* sur des cultures de cellules de souris et humaines. Il convient maintenant de vérifier ces données *in vivo* dans un modèle d'infection chez la souris. Dans un souci de réduction, afin d'obtenir des résultats significatifs, nous utiliserons des groupes de 12 souris et chaque expérience sera réalisée trois fois. Cependant, si après deux expériences les résultats obtenus sont statistiquement significatifs, la troisième expérience ne sera pas réalisée. Enfin, dans un souci de raffinement, les souris seront hébergées (4 ou 5 souris par cage selon la procédure) dans un environnement enrichi (igloo et nest) conformément aux conditions de l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles NOR : AGRG1238753A. Toujours dans un souci de raffinement, nos travaux antérieurs nous ont permis de définir les doses non létales de bactéries injectées permettant une infection des souris. Ces travaux nous ont permis d'identifier une dose infectante n'induisant pas de douleur chez l'animal pendant le temps court (72h) de

l'expérience. Pour finir, des points limites ont été définies pour éviter toute souffrance potentielle pendant l'expérience.

11459 L'endométriose est une pathologie atteignant 10% des femmes en âge de procréer. Des cellules de l'endomètre (muqueuse utérine) se fixent sur d'autres organes : ovaire, trompe, muscle utérin, vagin, intestin, et vessie principalement. Elle est responsable de douleurs chroniques pendant et/ou en dehors des règles, mais aussi de signes digestifs, urinaires, ou encore d'une infertilité. L'endométriose profonde atteignant le rectum est une des formes les plus invalidantes, et elle atteint 20% des patientes avec de l'endométriose. Le traitement médicamenteux est le plus souvent insuffisant et présente de nombreux effets secondaires. Un traitement chirurgical lourd est alors requis. Celui-ci implique une résection d'une partie de l'intestin dans la moitié des cas, et une résection de la lésion au plus proche de l'intestin, dans l'autre moitié des cas. Ce traitement expose la patiente à un risque de complications post-opératoires, dont la prévention peut nécessiter la réalisation d'un anus artificiel.

Le traitement par ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) repose sur la concentration intense d'énergie en un point précis créant une lésion capable de détruire le tissu. Ce procédé est bien développé en urologie dans le traitement du cancer de la prostate, par l'intermédiaire d'une sonde endorectale. En gynécologie, il est également évalué pour le traitement des fibroadénomes du sein (tumeurs bénignes), et des fibromes de l'utérus.

Une étude a été réalisée chez un petit nombre de patientes atteintes d'endométriose profonde digestive, afin d'évaluer la faisabilité et la toxicité du traitement : les résultats ont montré une faisabilité de l'HIFU dans 81,8% des cas, et aucun effet secondaire grave n'a été relevé. Une amélioration significative des symptômes a été constatée.

Afin d'évaluer l'efficacité du traitement sur les nodules d'endométriose de manière objective, une étude microscopique des tissus traités paraît indispensable. Or, cette étude n'est pas éthiquement réalisable chez les patientes traitées, puisqu'elle nécessiterait a posteriori une chirurgie, qui justement cherche à être évitée dans ce contexte. Une étude sur modèle animal paraît donc pertinente.

Dans un premier temps, nous souhaitons mettre au point un modèle expérimental d'endométriose sous-cutanée sur souris, déjà décrit dans la littérature.

Dans un deuxième temps, nous prévoyons de traiter le tissu à l'aide d'une sonde HIFU, du même type que celle utilisée en clinique, et d'évaluer le ciblage correct ainsi que l'innocuité du traitement à court terme.

Dans un troisième temps, nous prévoyons de traiter les animaux et d'évaluer l'évolution du volume tumoral et les caractéristiques microscopiques des lésions créées à différents intervalles de temps après traitement.

Ce projet de recherche translationnelle mettra en œuvre au maximum 68 souris. Il s'agira d'injecter en sous-cutané chez des souris immunodéprimées, des cellules provenant d'une lignée cellulaire de cancer de l'endomètre humain, présentant des caractéristiques tissulaires proche de l'endomètre normal.

Les animaux subiront une injection sous cutanée de cellules pour l'inoculation de la tumeur, et un traitement HIFU par souris sous anesthésie.

Les trois procédures seront réalisées de façon séquentielle avec arrêt de l'expérimentation en cas d'échec.

La méthode choisie est celle qui permettra d'obtenir le modèle en utilisant le moins d'animaux possible contrairement à ceux qui utilisent des cellules murines d'animaux donateurs. Les souris seront surveillées régulièrement après injection : leur poids, leur comportement, leur bien-être, ainsi que les dimensions tumorales seront monitorées. Des points limites ont été définis : si un point limite était atteint, l'expérimentation serait interrompue et la souris euthanasiée.

11460 La greffe d'organes ou de moelle osseuse constitue le dernier recours pour de nombreuses pathologies arrivées à un stade terminal (maladies en échec de traitement). Cette chirurgie est maîtrisée mais elle comporte cependant aujourd'hui encore des limites. Parmi elles, figure le phénomène de rejet de greffe ou la réaction du greffon contre l'hôte (GvH). Dans le premier cas, le système immunitaire reconnaît l'organe greffé, « le greffon », comme étranger et l'attaque. Dans le deuxième cas, ce sont les cellules immunitaires présentes dans le greffon qui prennent l'organisme pour cible. Pour éviter ces phénomènes, les patients reçoivent des traitements immunosuppresseurs qui provoquent de sévères effets secondaires. Dénués de spécificité, ces traitements immunosuppresseurs inhibent totalement la réponse immunitaire des patients, les rendant vulnérables aux agents infectieux.

L'induction d'une tolérance immunitaire spécifique pourrait permettre de s'affranchir du rejet ou l'apparition d'une GvH ainsi que de la nécessité d'un traitement à vie avec des drogues immunosuppressives. Il existe chez la souris comme chez l'homme, une sous-population de cellules T CD8+ régulatrices, qui a la capacité de stopper le développement de réponses immunitaires indésirables et excessives. Cette population est présente à l'état physiologique en très faible quantité. Ce projet a pour objectif 1) de générer *in vivo* et de multiplier *ex vivo* ces cellules T CD8+ régulatrices et 2) d'évaluer *in vivo*, le potentiel de ces cellules T régulatrices dans le contrôle du rejet de greffe et de la GvH.

Nous allons évaluer cette nouvelle stratégie thérapeutique dans deux modèles murins : un modèle de greffe cutanée et un modèle de GvH, modèles déjà bien décrits dans la littérature. Le premier modèle consiste à prélever sur une souris euthanasiée un lambeau de peau qui est greffé sur le dos d'une souris anesthésiée. Le rejet greffe de peau est suivi pendant 15 jours. Le modèle murin de GvH consiste à injecter une seule fois par voie intraveineuse des cellules sanguines murines chez une souris vigile préalablement irradiée (sans système immunitaire). Le développement de la GvH chez ces souris est suivi quotidiennement pendant 120 jours. A la fin de chaque série expérimentale, les souris sont euthanasiées.

Ce projet respecte la règle des 3R. En effet l'utilisation d'animaux est nécessaire à ce projet car le modèle animal est le seul à l'heure actuelle permettant d'étudier une réponse immunitaire dans sa globalité étant de donné les nombreuses interactions cellulaires et moléculaires nécessaires à sa mise en œuvre. Le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum tout en préservant les effectifs nécessaires pour une évaluation statistiquement significative malgré la dispersion biologique. Considérant l'ensemble des procédures, le nombre d'animaux utilisés représente 359 souris sur 3 ans. Enfin, nous mettons en place toutes les dispositions permettant de minimiser les souffrances qui pourraient être associées à nos expériences : recours à l'anesthésie et à l'analgésie, suivi quotidien des animaux avec évaluation de la souffrance grâce à des fiches de score permettant la mise en place de points limites précoces et adaptés. Si un point limite est atteint chez une souris, elle sera tout de suite euthanasiée.

11461 L'objet de cette demande d'autorisation d'expérimentation animale est de caractériser un modèle poisson zèbre de l'ataxie spinocérébelleuse 7 (SCA7).

SCA7 est une maladie héréditaire dégénérative rare affectant principalement le cerveau et la rétine de l'œil. Des troubles à la marche et une perte d'acuité visuelle se développent à l'âge adulte et progressent inexorablement vers une issue fatale pour les patients. A ce jour, aucun traitement ne permet de prévenir ou retarder la dégénérescence neuronale et l'apparition des symptômes de cette maladie.

SCA7 est causée par une mutation dans la protéine ataxine-7, dont la fonction reste largement inconnue. L'ataxine-7 est bien conservée au niveau de l'évolution, notamment chez la souris et le poisson zèbre. Il existe déjà des modèles souris de SCA7 qui servent à comprendre les mécanismes physiopathologiques de la maladie. Cependant, en ce qui concerne la pathologie de l'œil, la souris présente une contrainte importante ; en effet, étant un animal nocturne, la composition de la rétine de souris diffère de celle de l'humain. Le poisson zèbre, qui est un animal diurne, possède une

composition de la rétine qui est plus proche de celle de l'humain, et représente donc un modèle de choix pour étudier la rétinopathie de SCA7.

Notre objectif est de caractériser un modèle SCA7 chez le poisson zèbre. Ce modèle a été généré par transgénèse en exprimant l'ataxine-7 mutée spécifiquement dans les neurones de la rétine. Notre projet vise à caractériser la structure et la fonction de la rétine avec des techniques que nous avons déjà développées dans notre laboratoire au cours des dernières années. Des larves de poissons âgées de 3-5 jours seront nécessaires pour notre étude. Pour obtenir ces larves, nous aurons besoin d'élever 60 poissons adultes géniteurs sur 3 ans. Une procédure expérimentale est mise en place pour obtenir une biopsie de la nageoire caudale pour fin de génotypage. Il faut noter que le nage du poisson n'est pas altérée à la suite de la biopsie de la nageoire caudale. De plus, la nageoire se régénère progressivement avec le temps.

Cette stratégie offre la possibilité de respecter la règle des 3R à plusieurs niveaux. Premièrement, le poisson zèbre SCA7 transgénique REMPLACERA le modèle souris pour comprendre les mécanismes par lesquels l'ataxine-7 mutée cause la dégénérescence des neurones de la rétine. De plus, comme nous possédons déjà des compétences pour l'analyse de l'œil du poisson (e.g. nous avons conduit récemment une étude pour comprendre le rôle de l'ataxine-7 sauvage dans le développement de l'œil), nous pouvons RAFINER nos protocoles expérimentaux pour REDUIRE le nombre de larves utiles à notre étude. En termes de RAFFINEMENT, nos analyses seront effectuées que sur les larves âgées de 5 jours maximum, afin d'éviter une douleur ou souffrance éventuelle chez le poisson adulte, et les biopsies seront faites sous anesthésie.

Les résultats de cette étude devraient permettre d'améliorer notre compréhension des mécanismes menant à la cécité chez les patients atteints de SCA7.

11462 La peau est le plus étendu des organes du corps humain qui assure plusieurs fonctions vitales pour l'organisme. Cet organe est soumis tout au long de la vie à de nombreux dommages, provoqués par des facteurs extérieurs d'origine physique (coupures), mécanique (ulcères), thermique (brûlures) et/ou chimique (radiations). La sévérité des dommages couplés à d'autres facteurs, tels que l'âge, le diabète et la nutrition, peuvent conduire à une mauvaise voire non-cicatrisation des plaies, appelées les plaies chroniques. Elles impactent fortement la qualité de vie des patients, jusqu'à engager leur pronostic vital. Ce problème de santé publique est amené à s'accroître avec le vieillissement de la population et l'augmentation de la prévalence du diabète et de l'obésité.

Les avancées dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la réparation des plaies, ont conduit au développement de biomatériaux implantables basé sur la mise au point de supports tridimensionnels qui représente une des thématiques de notre équipe.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de biomatériaux actifs et d'origine naturelle développés au laboratoire. Ces biomatériaux se présentent sous forme de patch, destinés à délivrer des molécules bioactives qui améliorent le processus de cicatrisation cutanée. Nous souhaitons déterminer le devenir de ces patchs (biocompatibilité, biodégradation, infiltration cellulaire par les cellules de l'hôte, libération des molécules bioactives), ainsi que leurs rôles dans la cicatrisation du derme. Ils seront appliqués directement sur la plaie, induite chez le rat et la souris.

Parmi les modèles de cicatrisation cutanée qu'on retrouve dans la littérature, nous avons retenu celui faisant appel à une biopsie cutanée suivie de la mise en place de disque de silicone permettant d'éviter la rétraction spontanée de la peau. Ce modèle présente l'avantage de refléter au mieux le phénomène de cicatrisation humaine.

Dans un premier temps, une étude de la cicatrisation sera conduite par analyse de la plaie induite chez la souris sur une durée de deux semaines. Dans un second temps, la libération des molécules bioactives au sein de la plaie chez le rat sera suivie par imagerie nucléaire deux heures après apposition du dispositif. L'utilisation d'une deuxième espèce de rongeur (rat) se justifie pour des raisons de résolution des systèmes d'imagerie.

Les mesures nécessaires seront prises pour limiter la douleur et le stress des animaux par l'utilisation d'anesthésiants et d'analgésiques au cours de l'induction du modèle de biopsie cutanée et de l'imagerie. Un suivi du bien-être des animaux sera réalisé quotidiennement par des personnes

compétentes au cours de ce projet par un contrôle régulier de l'état de santé des animaux avec recours aux analgésiques si nécessaires. Par ailleurs, des points limites ont été définis d'après des grilles d'évaluation basées sur l'état spécifique de la plaie et l'état général de l'animal.

La cicatrisation est un processus complexe et les méthodes d'analyse *in vitro* ne prennent pas en considération l'environnement locale et systémique impliqués dans le processus. De plus, à ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives pour modéliser le développement de plaies cutanées, donc l'utilisation de modèles animaux est nécessaire pour évaluer l'efficacité de notre dispositif. Pour réaliser cette étude nous avons tenu compte du nombre d'animaux à évaluer de façon à obtenir les informations scientifiques recherchées en fonction des risques statistiques d'erreur (5%) et de la puissance des tests (80%). Le nombre d'animaux utilisés pour la période du projet a été évalué à 380 sur 5 ans. L'ensemble des animaux sera euthanasié à la fin de l'expérience.

11463 A – Contexte, objectifs et résultats obtenus *in vitro*

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (ADKP) est la forme la plus fréquente des cancers du pancréas, et qui compte parmi les cancers les plus agressifs. Le mauvais pronostic des patients atteints de cette maladie est, à la fois, le résultat d'un diagnostic souvent tardif (présence d'invasion locale et de métastases), et d'une résistance aux thérapies couramment utilisées. Le phénomène de remodelage neural qui survient au cours du développement de ce cancer et qui touche plus de 90% des patients, intervient à la fois dans les douleurs ressenties, qui participent à diminuer la qualité de vie des patients, ainsi que dans la formation de métastases. En effet, la présence de nombreuses fibres nerveuses dans la tumeur du pancréas est décrite comme étant un chemin par lequel les cellules tumorales peuvent s'échapper du site tumoral primaire afin de coloniser d'autres régions de l'organisme. Actuellement, aucune stratégie thérapeutique ne permet de cibler efficacement ce processus de remodelage neural associé au cancer pancréatique.

Le remodelage neural est caractérisé par une croissance anormale des cellules nerveuses au sein du pancréas, qui ont alors la capacité d'interagir avec les cellules tumorales pancréatiques.

Ce phénomène, qui favorise l'agressivité des cellules tumorales pancréatiques, est basé sur un dialogue complexe et efficace, établi entre les différentes cellules nerveuses et tumorales.

L'hypothèse de cette étude est que le TGF-beta, décrit à la fois pour ses rôles physiologiques et pathologiques, est l'un des facteurs impliqués dans le dialogue entre les cellules nerveuses et les cellules tumorales pancréatiques.

Des études réalisées sur des cellules cultivées, démontrent que des cellules nerveuses sont capables de sécréter du TGF-beta qui permet de favoriser les capacités de migration, d'invasion et de survie de cellules pancréatiques tumorales.

De plus lorsque l'action du TGF-beta, sécrété par les cellules nerveuses est bloqué, les cellules tumorales pancréatiques voient leurs capacités de migration et de survie diminuées.

Ce projet de recherche propose, à l'aide d'un modèle d'étude animal (xénogreffe hétérotopique sous-cutanée chez la souris), i- de décrire plus précisément les effets des cellules nerveuses sur les capacités de prolifération, de migration et de survie des cellules tumorales pancréatiques, et ii- de décrire le rôle du TGF-beta dans ce phénomène.

Ce projet de recherche permettra donc de décrire un processus physiopathologique décrit dans le développement du cancer pancréatique et d'évaluer la possibilité de réduire ce mécanisme en ciblant le TGF-beta.

B – Utilisation d'un modèle animal

En conformité avec les exigences de réduction, de raffinement et de remplacement de modèles animaux :

- l'utilisation de l'animal a été en parti remplacé par l'utilisation de cultures cellulaires
- cette étude se fera donc sur la base de résultats robustes obtenus *in vitro*
- cette étude fera l'utilisation d'un modèle de xénogreffes hétérotopiques sous-cutanées réalisées sur des souris BALB/c athymic Nude, pour lesquelles les paramètres de zootecnies sont connus

- le nombre de ces animaux utilisés sera le plus petit possible, permettant l'obtention de données exploitables et statistiquement interprétables
- un personnel qualifié s'assurera du bien-être quotidien des animaux, du bon suivi du protocole qui sera établi au préalable, décrivant notamment des signes évocateurs de souffrance ou de mal-être (i.e. définition de points limites) entraînant l'arrêt immédiat de l'expérimentation sur ces animaux (euthanasie des souris).
- de plus en fin de procédure pour chaque souris, sera prélever les organes (poumons, foie, pancréas) dans l'optique d'analyse ultérieures en relation au développement tumoral, permettant ainsi une exploitation maximale des animaux utilisées pour cette étude.

Le nombre total d'animaux utilisé sera de 193 souris BALB/c athymic Nude.

11464 La malnutrition désigne un état pathologique causé par la carence (sous-nutrition) ou l'excès d'un ou de plusieurs nutriments (sur-alimentation). Elle peut être provoquée par un apport alimentaire insuffisant, un déséquilibre de la balance nutritive, ou à une altération de la digestion et une mal absorption des nutriments.

La sur-alimentation est une ingestion régulière d'une quantité de nourriture supérieure à la ration nécessaire pour l'entretien de l'organisme qui peut aggraver la prise de poids et le développement de l'obésité. L'obésité est souvent associée au développement des pathologies chroniques comme des maladies inflammatoires (l'inflammation chronique à bas bruit ou l'arthrite), le diabète de type 2 et certains cancers. De plus du développement de ces pathologies, des données récentes ont pu mettre en évidence une dysbiose du microbiote intestinal qui est un des régulateurs clés du métabolisme de l'hôte. Plusieurs traitements peuvent être utilisés pour corriger cette dysbiose. Les traitements les plus courants utilisent des médicaments comme les antibiotiques ou les aliments fonctionnels comme les probiotiques. Dernièrement, des études récentes ont montré l'efficacité de l'administration des probiotiques sur la prise de poids et le développement du diabète de type 2. Cependant, les effets sur la santé restent modestes et nécessitent d'identifier de nouvelles souches bactériennes efficaces qui pourraient être utilisées dans le traitement du diabète de type 2. Nos données préliminaires obtenus au sein du laboratoire et grâce au protocole LS-005 2014 montrent un effet bénéfique de l'administration d'une souche bactérienne, *Lactobacillus plantarum*, sur le métabolisme de l'hôte et qui semble passer par une augmentation de la production de certains peptides intestinaux comme le GLP-1.

Ces observations légitiment la réalisation d'une étude scientifique qui devrait : 1) Identifier des nouvelles souches bactériennes de *Lactobacillus plantarum* efficaces et capables d'interagir avec le métabolisme glucidique de l'hôte, et 2) Comprendre le(s) mécanisme(s) d'action induit(s) par les bactéries pour moduler le métabolisme et plus précisément d'évaluer la modulation de l'axe incrétine dans un système de souris invalidées pour le gène codant pour le récepteur au GLP-1.

Nous prévoyons l'utilisation d'un maximum de 288 souris sur une période de 4 ans tout en respectant les règles des 3R : en utilisant le nombre d'animaux à minima dans notre étude et tout en respectant leur bien-être et en soulageant leur douleur si elle est provoquée. Signalons que le poids et le statut métabolique de chaque animal sera suivi individuellement chaque semaine afin d'identifier tout signe de souffrance que les animaux pourraient développer en cours d'expérimentation. Ce nombre de souris nous permettra de tester l'effet protecteur du probiotique *Lactobacillus plantarum* contre le développement du diabète de type 2 et d'identifier le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) impliqués dans cette protection.

11465 Chez l'Homme, les cancers cutanés de l'épiderme sont en augmentation et constituent donc un problème de santé publique. Comprendre l'influence du microenvironnement tumoral sur les fonctions des cellules du système immunitaire au niveau de la peau est une étape importante afin d'identifier et de valider des approches d'immunothérapies anti-cancéreuses. En effet, les tumeurs épithéliales se développent suite à une défaillance de l'immunité anti-tumorale et il est donc crucial de pouvoir reprogrammer cette immunité. Nous avons identifié une immunothérapie péritumorale qui induit la régression de tumeurs cutanées dans un modèle murin. Cette immunothérapie est

basée sur l'injection de la combinaison de deux molécules au sein des tumeurs pour renforcer la défense immunitaire antitumorale. Dans la continuité de cette découverte, nos objectifs actuels sont de déterminer le mécanisme immunitaire précis de cette stratégie d'immunothérapie locale afin d'optimiser son efficacité. Pour cela nous proposons d'identifier les cellules immunitaires indispensables à la régression tumorale et de caractériser le phénotype et les fonctions des cellules immunitaires présentes dans la tumeur à la suite de l'intervention thérapeutique.

D'un point de vue expérimental, nous utiliserons un modèle murin de cancer épithélial qui consiste à implanter une lignée tumorale murine au niveau de la peau des souris de même fond génétique (modèle syngénique). Dans ce modèle murin établi dans le laboratoire, la souris porte une tumeur dont l'infiltrat immunitaire présente des similitudes avec le cancer épithélial de la peau chez l'Homme. Ce modèle murin de cancer de la peau permet l'apparition rapide d'une tumeur et constitue un modèle approprié pour la validation et l'optimisation de cibles d'immunothérapie. De plus, ce modèle tumoral se développe sur un fond génétique dans lequel de nombreux outils immunitaires sont disponibles et compatibles avec l'analyse mécanistique d'une cible thérapeutique. Nous identifierons les cellules immunitaires et les mécanismes fonctionnels importants dans la régression tumorale en comparant l'impact de notre immunothérapie locale sur la croissance des tumeurs dans des souris contrôles et des souris dans lesquelles chaque cellule immunitaire d'intérêt est retirée ou enrichie pour évaluer son rôle dans la réponse à l'immunothérapie.

Au total, nous aurons besoin au maximum de 1110 C57BL/6J et 960 souris génétiquement modifiées ou leurs contrôles pour répondre à nos questions biologiques sur 5 ans et obtenir des résultats statistiquement valides.

Le nombre d'animaux a été déterminé en tenant compte des 3Rs :

Réduction : Nous planifions une analyse séquentielle basée tout d'abord sur une analyse exploratoire de l'impact de l'immunothérapie dans des souris sauvages ce qui permettra de préciser les temps d'analyse et la nature des populations immunitaires à cibler dans les procédures suivantes. Le nombre d'animaux utilisés dans les procédures 2 à 5 dépendra donc des populations immunitaires sélectionnées. Nous avons déterminé les effectifs de nos groupes de manière à obtenir une forte validité statistique avec un minimum d'individus.

Remplacement : Il n'y a pas actuellement de méthodes alternatives *in vitro* permettant de mimer l'environnement épithélial tumoral.

Raffinement : Le suivi de l'évolution des lésions, le suivi des animaux seront effectués conformément à une grille d'évaluation permettant de définir un niveau de douleur/souffrance à partir duquel les animaux concernés seront euthanasiés. De plus, afin de limiter la douleur, nous avons mis un point limite de croissance tumorale suffisant pour notre expérimentation et en deçà du point limite maximum autorisé réglementairement pour les tumeurs. Par ailleurs, nous ne pouvons pas utiliser de traitement analgésique pour gérer la douleur car cela pourrait interférer avec l'analyse du rôle des cellules immunitaires, qui est le propos de l'étude. L'observation clinique permettra donc de contrôler toute douleur éventuelle et d'euthanasier tout animal manifestant des signes de souffrance (prostration, apathie). De plus, les animaux sont manipulés par un expérimentateur unique afin de réduire leur stress et hébergés dans un environnement enrichi par groupe de cinq.

11466 Le Psoriasis est une maladie de la peau qui affecte 2% de la population mondiale caractérisée par une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme et une inflammation de la peau. Les processus responsables du déclenchement du psoriasis restent peu connus. Cette demande de projet fait suite à une étude dans laquelle nous avons identifié de nouveaux acteurs (molécules) de la pathogénèse de cette maladie grâce à un modèle chez la souris mimant le psoriasis. De plus, nous avons montré que ces acteurs étaient également induits chez les patients humains atteints par cette maladie.

Afin de déterminer si ces molécules peuvent constituer des cibles thérapeutiques, nous souhaitons induire une inflammation de la peau similaire à celle observée dans le psoriasis, chez des souris mutées, par une application cutanée d'Aldara. L'Aldara est une crème utilisée chez l'Homme pour

le traitement de différentes maladies de la peau, dont le principe actif est l'imiquimod, un ligand de récepteurs cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire. L'imiquimod est un modificateur de la réponse immunitaire. Appliquée sur une peau saine, cette crème déclenche une inflammation similaire à celle observée dans le psoriasis. Dans l'espoir d'améliorer les traitements existants, une partie du projet consistera en l'application de molécules présentant un potentiel thérapeutique chez les animaux traités.

L'Aldara et les molécules d'intérêts seront appliqués au niveau de l'oreille des animaux une fois par jour, puis les échantillons seront collectés après 5 jours de traitement. La réponse immunitaire sera caractérisée. Ce projet nous permettra d'identifier les événements impliqués dans les différentes phases de la réponse immunitaire et de déterminer l'effet des molécules d'intérêts. Nous analyserons l'expression des gènes et les cellules présentes au niveau de l'épiderme et du derme de l'oreille, ainsi que dans les ganglions drainants.

Remplacement : les molécules pouvant présenter un potentiel thérapeutique ont été sélectionnées grâce à des tests *in vitro* de cultures cellulaires de souris et humaines. Les cibles ont été déterminées par des analyses chez des patients atteints de psoriasis et ces résultats ont été confirmés par des tests *in vitro* et *ex vivo* de culture d'épiderme de souris. Néanmoins, les phénomènes à l'œuvre dans ces réactions immunitaires mettent en jeu différents organes et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour confirmer nos résultats, comprendre cette réponse inflammatoire et identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques

Réduction : Ce protocole sera appliqué à un maximum de 204 souris afin d'identifier les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaire. Ces animaux seront répartis dans les différentes phases du projet afin de (1) tester de nouveaux traitements thérapeutiques, (2) caractériser le rôle des nouveaux acteurs identifiés, et (3) étudier les mécanismes d'action des traitements. L'effectif par groupe sera de 8 animaux qui est l'effectif minimal qui nous permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différents paramètres mesurés.

Raffinement : l'administration de l'imiquimod se fait par application cutanée effectuée sous anesthésie gazeuse légère. Durant le protocole, la surveillance s'effectue tous les jours. Au jour 5, les oreilles des animaux présentent une inflammation modérée se traduisant par une rougeur et un gonflement qui n'altèrent pas le comportement des souris (peu de signes de démangeaison par exemple). Néanmoins, si des lésions devaient apparaître au niveau des oreilles, par exemple du fait de grattements intempestifs, l'animal sera retiré de l'étude et bénéficiera de soins adéquats.

11467 Le rapport d'Expertise collective INSERM publié en juin 2013 souligne la présomption forte d'un lien entre l'exposition professionnelle aux pesticides et le risque de développer certaines pathologies (Parkinson, certains cancers, maladies métaboliques et les altérations du système immunitaire). Le risque encouru pour leur santé nécessite de documenter les niveaux d'exposition dans l'ensemble des contextes professionnels utilisant des pesticides ou en contact avec ces composés (agriculteurs, cueilleurs, saisonniers...) et d'améliorer ainsi les connaissances sur les expositions et sur leurs impacts. L'identification des niveaux d'exposition et des produits utilisés est donc aujourd'hui une étape cruciale pour une meilleure appréhension de l'étude de l'impact de ces composés sur la santé.

Avec une moyenne de plus de 40 traitements/an, la culture de la pomme qui sera le support de nos études est très consommatrice de produits phytosanitaires. Or cette culture est une production majeure dans la région Midi-Pyrénées et particulièrement dans le Tarn-et-Garonne où elle représente 42% des surfaces cultivées et 10% de la production nationale.

Les études envisagées chez la souris nous permettront de rechercher des arguments mécanistiques sur la relation pesticide et santé pour les composés retrouvés au niveau des pommes en tenant compte des doses pulvérisées de pesticides et des doses qu'on retrouve à la surface des feuilles et des pommes. Ceci permettra de mimer au mieux une exposition cutanée des professionnels étant donné que la peau est une voie d'entrée importante pour les polluants de notre environnement.

Les tests mis en œuvre cibleront donc les pesticides pulvérisés et retrouvés dans les pommeraies, mais également des formulations alternatives aux pesticides, développées par une société, ayant un faible impact pour l'homme et améliorant la santé des plantes. Ces composés seront évalués seuls ou associés à une irradiation aux UVs afin de mimer également une courte durée d'exposition au soleil des travailleurs.

L'effet de ces pesticides retrouvés dans les pommeraies a été évalué dans un premier temps sur différents types cellulaires du système immunitaire, ce qui a permis de définir les doses de pesticides, l'intensité d'irradiation aux UVs et donc de diminuer le nombre d'animaux à utiliser pour la suite de notre étude. Le recours à l'animal reste néanmoins nécessaire pour vraiment identifier l'impact des pesticides sur la santé due au microenvironnement, mais aussi au fait qu'on veuille évaluer l'impact des pesticides sur une atteinte plus générale (peau, sang, foie, cerveau) pour identifier d'éventuels troubles métaboliques et évaluer les risques de développer certaines maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer...). Une procédure de raffinement sera donc appliquée au cours de cette étude. À leur arrivée, les animaux disposeront d'une période d'acclimatation d'une semaine avant d'entreprendre les procédures. Les animaux seront hébergés dans leur cage avec leurs congénères habituels (cage collective sur portoir ventilé) pour évaluer leur comportement social, avec libre accès à l'eau, à l'alimentation et aux objets enrichissants leur cage (maisons, bouts de bois...). Les souris seront observées quotidiennement afin d'évaluer leur bien-être. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure (perte de poids supérieure à 20% ou prise de poids supérieure à 40% du poids initial, posture de prostration, signes de mutilations, difficulté respiratoire). Les expériences seront organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux en collectant le plus de données possible étant donné que l'ensemble de cette étude comprendra 360 souris C57BL/6.

11468 Des résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont démontré le rôle crucial de la flore intestinale dans la croissance tumorale et l'efficacité de traitements anti-cancéreux. En effet, ces résultats montrent que certaines bactéries de la flore intestinale permettent la réinduction d'une réponse immunitaire anti-tumorale qui se trouve supprimée par les cellules cancéreuses. Ainsi, ces bactéries réduisent la croissance tumorale et amplifient l'effet de chimiothérapies et immunothérapies connus pour activer le système immunitaire.

Notre objectif est d'analyser l'influence de différentes bactéries de la flore intestinale sur l'activation du système immunitaire et sur l'efficacité anti-tumorale d'immunothérapies dans le cancer du rein. Par ailleurs, nous voulons déterminer le mécanisme d'action de ces bactéries pour activer le système immunitaire anti-tumoral.

Pour cela, nous administrerons des bactéries spécifiques et, après injection de lignées tumorales, les souris seront traitées ou non avec l'immunothérapie. Ces expérimentations vont nous permettre de déterminer les bactéries améliorant la réponse aux immunothérapies, et ainsi d'envisager une supplémentation en bactéries comme traitement adjuvant (additionnel) aux traitements anti-cancéreux.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité, le microbiote, l'immunité anti-tumorale et l'effet des immunothérapies sur la réponse anti-tumorale dans un contexte tumoral, avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire *in vitro* ou *ex vivo*. Le projet nécessitera 4286 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques, les différentes souches bactériennes et les différents types de cellules tumorales utilisés.

Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité, le microbiote, l'immunité anti-tumorale et l'effet des immunothérapies sur la réponse anti-tumorale dans un contexte tumoral, avec toutes les interactions nécessaires.

D'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles et ainsi d'éviter la répétition d'expérimentations. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, en ayant recours à l'anesthésie locale ou générale dépendant des gestes techniques. Les contraintes principales pour les animaux seront pour certaines procédures l'implantation de tumeurs. Ces contraintes seront limitées par un suivi très strict avec application de points limites, limitation des tailles de tumeurs par mesure physique (sous-cutanée) ou au moyen d'imagerie optique de luminescence des reins des animaux (qui permet aussi un suivi longitudinal non invasif plus raffiné).

11469 Ce projet constitue une étude pilote pour la mise en place d'un programme de développement d'un nouveau traitement ciblant une maladie neurologique.

Dans ce projet, nous avons dans un premier temps besoin de déterminer la meilleure voie d'administration et le vecteur le plus approprié, afin de pouvoir décider des paramètres optimaux pour travailler avec les futurs traitements en développement.

Le vecteur consiste en un virus modifié utilisant les capacités d'intégration, sans effet délétère. Les deux virus-vecteurs à tester ont des capacités différentes en terme de propagation et de ciblage des tissus. Le but de ce projet sera donc de caractériser la répartition de chacun de ces vecteurs, dans les tissus des Souris injectées, pour la suite du projet.

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

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

Les AAV doivent diffuser différemment jusqu'aux cellules d'intérêt selon les tissus visés, que cela soit au niveau périphérique ou central.

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

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

Nous allons comparer ainsi les voies intraveineuses (i.v.), intracérébroventriculaire (i.c.v.) et intracérébrale (ic, striatum et hippocampe) dans cette étude, et évaluer la présence et l'activité de deux AAV différents dans les tissus d'intérêts.

Le projet consistera à injecter les vecteurs viraux par les différentes voies d'administrations et à déterminer leur intégration et leurs capacités à exprimer le traitement d'intérêt.

Nous prévoyons d'utiliser pour cette étape, des souris mutantes, qui seront ensuite utilisées dans la suite du projet, âgées de 23 jours. Un total de 45 souris pour le protocole sera utilisé, correspondant à un effectif de 5 animaux par traitement et par voie, en incluant des animaux contrôle et additionnels pour s'assurer de la validité des injections. Les souris additionnelles sont incluses afin de parer à un éventuel souci technique durant les injections, il s'agit en effet de gestes complexes et nous préférons anticiper ces animaux pour obtenir un taux de réussite de 100 % au niveau des techniques d'injection. 4 semaines après les injections, les souris seront euthanasiées pour prélever les cerveaux et étudier l'expression dans les différents tissus.

Toutes les précautions en terme d'analgésie et d'anesthésie seront prises, et adaptées selon la voie d'administration.

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

Au total, nous pourrions utiliser un maximum de 85 souris pour l'expérience. Toutes les démarches visant à réduire le nombre d'animaux expérimentaux et à raffiner nos techniques seront mises en place pour satisfaire aux impératifs éthiques que nous suivons.

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

11470 Les produits chimiques et agrochimiques doivent faire l'objet d'un ensemble de tests réglementaires de toxicité afin de définir les conditions sécurisées de leur manipulation sur leur lieu de fabrication, leur stockage, leur transport et leur utilisation par les consommateurs dans la vie de tous les jours. Cette étude répond à la norme OCDE suivante :

Le test OCDE 440 est conçu pour déterminer la toxicité de produits chimiques et agrochimiques, notamment leur susceptibilité d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien et pour permettre d'évaluer le risque pour la santé humaine ou l'environnement C'est un bio-essai utéro-trophique réalisé chez les rongeurs pour dépister à court terme des substances capable de provoquer une activité biologique analogue à celle des agonistes (ou antagonistes) des œstrogènes naturels. Ce pouvoir œstrogénique est évalué par l'observation d'une variation de poids utérin chez les rongeurs.

Bien qu'instructive, l'affinité d'un ligand et d'un récepteur œstrogénique ou l'activation transcriptionnelle des gènes rapporteurs *in vitro* ne représente qu'un déterminant parmi plusieurs, d'un danger possible. Les autres facteurs déterminants peuvent être l'activation et la désactivation métaboliques lors de l'entrée dans l'organisme, la distribution entre les tissus cibles, et l'élimination de l'organisme, qui dépendent, au moins en partie, de la voie d'administration et du produit chimique testé. Il est par conséquent nécessaire de dépister l'activité éventuelle d'un produit chimique *in vivo* dans des conditions appropriées, sauf si les caractéristiques ADME (absorption - distribution - métabolisme - élimination) du produit chimique fournissent déjà les informations indispensables.

Cette étude est effectuée chez des rattes immatures tout juste sevrées (sevrage précoce réalisé en interne) avec un nombre total d'animaux utilisés de 33 au maximum, selon les résultats obtenus. Cette étude n'est réalisée qu'après analyse des données existantes sur la substance d'essai (toxicité, cinétique, *in vitro*, *in vivo* ou encore *in silico*) afin de choisir les doses appropriées à tester. En absence de données et uniquement dans ce cas, des essais préliminaires réalisés sur un à trois animaux permettent de choisir la dose maximale adaptée pour l'essai principal. Les tests sont ensuite réalisés avec un nombre restreint d'animaux, afin de limiter les souffrances et le nombre total d'animaux utilisés.

Ce test ne met pas en jeu de mortalité, de ce fait il ne faut pas administrer des substances d'essai à des niveaux de dose provoquant des douleurs et une détresse importante voir la mort. Un protocole d'euthanasie est prévu en cas de souffrances conséquentes des animaux et d'apparition de points limites définis au préalable.

11471 Les coccidioses sont des maladies dues à l'infection par des protozoaires parasites, les coccidies, qui sont les parasitoses les plus dommageables en aviculture aux niveaux sanitaire et économique. Les coccidies se développent dans l'intestin grêle et les caeca des oiseaux. Les coccidioses sont caractérisées par des retards de croissance, de la diarrhée et de la prostration, parfois des diarrhées hémorragiques et de la mortalité. De plus, elles favorisent l'émergence d'agents pathogènes opportunistes. La différence entre présence de coccidies et coccidioses est rarement faite et les traitements curatifs sont souvent inadaptés en absence de diagnostic de certitude de la maladie.

Afin d'aider au diagnostic pertinent de coccidiose, il est envisagé d'organiser des formations avec une partie théorique sur la biologie des parasites et sur les éléments pertinents de diagnostic

illustrés par des schémas, des photos et des vidéos, et une partie pratique avec des oiseaux préalablement infectés pour montrer les altérations comportementales, la dégradation des matières fécales et les lésions du tube digestif qui sont les critères les plus importants. Au cours de ces séances qui durent une journée, les participants ne manipulent pas d'oiseaux vivants et ne pratiquent pas d'euthanasie. Seul le personnel formé à l'expérimentation animale intervient.

Il est prévu d'effectuer quatre formations sur poulets chaque année, pendant trois ans. Le nombre de sujets nécessaires à chaque formation est de 29, le nombre total de sujets pour ces formations sur trois années est de 348 poulets.

Ces formations sont destinées aux techniciens avicoles, aux vétérinaires et aux personnels des laboratoires d'analyses vétérinaires. Le nombre de participants est limité à dix pour chaque session.

Les oiseaux sont hébergés dans des animaleries exemptes de coccidies jusqu'au transfert dans l'animalerie servant à la formation. Ils sont hébergés dans des cages conformes à la nouvelle réglementation, avec enrichissement, à raison de sept à douze individus. L'âge à la mise en place est d'environ 20 jours (plus ou moins trois jours). La séance de formation se passe avec des oiseaux âgés de 28 jours (plus ou moins trois jours). Cet âge correspond à l'âge auquel les problèmes de coccidiose sont le plus fréquemment rencontrés sur le terrain.

Les infections parasitaires se font entre 4 et 7 jours avant la date de la séance, en fonction des espèces de coccidies (cycle de développement spécifique à chaque espèce de coccidie). Le but est d'obtenir un développement des parasites permettant d'observer les manifestations cliniques et les lésions du tube digestif lors de la séance.

Les coccidies du poulet étant strictement inféodées à leur hôte, il est indispensable d'utiliser des poulets. Il n'existe pas de système alternatif permettant de montrer les lésions ; les supports visuels présentés dans la partie théorique sont une première approche importante mais insuffisante à elle-seule.

Le but est de renforcer et d'enrichir les connaissances sur les coccidies en apportant des éléments nouveaux, de faire la distinction entre les différentes espèces et leurs caractéristiques, d'apporter une aide au diagnostic aux personnes qui réalisent ces examens afin de réduire les erreurs ou confusions, et de limiter les traitements curatifs inutiles. Cette formation s'inscrit dans la gestion raisonnée de l'aviculture et du contrôle des affections majeures chez les volailles.

11472 Un nombre très important de travaux ont montré que la période périnatale et l'adolescence sont des phases de vulnérabilité importante aux effets délétère du stress alors que les adultes seraient plus résistants et plus résilients.

Des travaux récents chez la souris ont caractérisé une seconde phase de vulnérabilité au stress qui apparaît chez l'adulte d'âge avancé, aux alentours de 10-12 mois (soit 45-50 ans en équivalent humain). Ainsi, des sujets d'âge moyen exposés à un stress chronique développent des déficits de mémoire spatiale et de mémoire de travail comparables à ceux de sujets âgés. Par ailleurs, outre ces effets immédiats d'une exposition à un stress chronique, des conséquences à long terme ont aussi été caractérisées. Ainsi, des souris ayant subies une période de stress chronique à l'âge de 10-12 mois présentent des déficits cognitifs accrus à l'âge de 20 mois (~70 ans en équivalent humain), relativement à des sujets du même âge non exposé au stress.

Le rôle de la vulnérabilité au stress dans l'émergence de troubles de mémoire avec le vieillissement a été très peu étudié. De plus, les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent ces déficits mnésiques sont effectivement encore mal compris, c'est pourquoi il est avant tout nécessaire de mieux les identifier et les comprendre pour favoriser leur prise en charge.

Ces dernières années, les progrès dans l'identification des mécanismes cellulaires et moléculaires de la formation de la mémoire ont montré l'importance des régulations qui modifient l'expression des gènes.

Ainsi, par une approche pluridisciplinaire (comportementale, pharmacologique, et moléculaire), l'objectif de cette étude est de mieux comprendre et de mieux caractériser la nature des perturbations mnésiques qui apparaissent avec l'âge et d'identifier le rôle du stress chronique dans

l'émergence de ces perturbations en prenant en considération l'organisation des systèmes de mémoire et les remaniements de circuits neuronaux impliquant l'hippocampe, l'amygdale et le striatum. D'autre part, il s'agira également d'identifier les mécanismes de régulation de l'expression des gènes chez les sujets âgés stressés pouvant expliquer des dysfonctionnements durables de l'activité cérébrale. Enfin, il sera déterminé si des traitements ciblant ces régulations géniques permettent de prévenir le vieillissement cognitif et l'impact du stress chronique sur le fonctionnement mnésique, non seulement d'un point de vue quantitatif (performance) mais aussi qualitatif (type de mémoire utilisé).

L'effectif total est de 354 souris. Tout au long des expériences, la règle des 3R sera mise en application.

Les expériences ont été conçues en amont de façon à optimiser le recueil des données pour chaque animal grâce à l'application de différents tests de façon longitudinale et permettre de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les effectifs des différents groupes ont été ajustés au minimum pour obtenir des résultats statistiquement fiables compte tenu des variations interindividuelles face au vieillissement établies lors des études préalables.

Par ailleurs, afin de réduire les souffrances, un essai d'administration d'un traitement dans l'eau de boisson sera réalisé afin de remplacer dans la mesure du possible le traitement plus invasif classiquement utilisé et administré par injections intrapéritonéales. Les animaux contrôles (non stressés) sont hébergés par groupe de 4-5 avec à disposition des tunnels de jeu et différents matériaux de construction du nid. Enfin, des points limites spécifiques ont été définis, en particulier pour les animaux exposés au stress chronique (voir procédures).

11473 Nos recherches ont pour but de développer de nouvelles techniques d'acquisition *in vivo* fondées sur la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), plus communément appelée IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et SRM (Spectroscopie par Résonance Magnétique). Le but est d'améliorer les informations anatomique, biochimique et biomécanique sur les tissus vivants pour mieux diagnostiquer certaines pathologies. Les nouvelles techniques développées dans ce projet consistent à écrire partiellement ou intégralement de nouvelles séquences RMN parfois couplées à un dispositif d'élastographie ou optique. Ces nouvelles séquences et /ou dispositifs nous permettront de mettre en place de nouveaux biomarqueurs jusqu'ici inexistantes ou plus simplement d'améliorer la qualité des images RMN existantes. Quatre techniques seront utilisées : l'excitation RMN par contrôle optimal pour optimiser le signal ou le contraste dans l'image, l'élastographie du foie pour évaluer l'altération de ses propriétés mécaniques, l'imagerie spectroscopique multidimensionnelle pour quantifier la structure chimique des tissus et la synchronisation optique pour améliorer l'imagerie cardiaque. Dans le cas où nos recherches aboutiraient, ce projet permettra non seulement de passer à la phase de recherche sur l'homme (bénéfices dans le monde hospitalier) mais aussi de valider des techniques de diagnostic sur le petit animal. Ainsi ce type de techniques non-invasives pourrait se démocratiser et devrait donc diminuer des techniques de type invasif comme des prises de sang, biopsies, autopsies ... Ceci aura pour effet de diminuer le nombre et la souffrance des futurs animaux faisant l'objet d'études similaires.

Toutes ces techniques basées sur la RMN intégreront des procédures non-invasives et non-ionisantes où seul le dommage occasionné sur l'animal sera l'anesthésie générale gazeuse. Mais avant cela, la grande majorité des développements, nécessitant la programmation des imageurs RMN, sera réalisée sur des solutions, échantillons tests de composition parfaitement connue. Une fois la technique mise au point, nous devons la valider *in vivo*. La validation se fera sur des souris saines et une même souris sera examinée plusieurs fois. De par notre expérience, nous évaluons la fréquence moyenne des examens à 11 jours par an et par animal ce qui représente 2 heures d'anesthésie par mois et par animal. Ainsi, nous utiliserons un nombre très réduit d'animaux et nous estimons de façon grossière un remplacement des animaux chaque année. Il va de soi qu'un groupe d'animaux dépassant un an en âge ne sera pas euthanasié si ce dernier ne présente aucun comportement inhabituel laissant suggérer un mal-être. Pour développer une vie communautaire, 6 souris dans une cage seront nécessaire chaque année pour que le projet soit correctement mené, soit 30 souris saines sur la durée totale du projet soit 5 ans. La RMN est une technique peu sensible

et il se peut que le signal provenant d'un organe tel que le foie ou le cerveau ne soit pas suffisant pour le détecter. Nous aurons alors besoin de rats présentant des organes plus gros. Donc si et seulement si les études sur souris ne permettent pas de valider nos techniques alors nous aurons besoin de 4 rats placés dans une cage. Si ce manque de signal se révèle chaque année, nous utiliserons alors au maximum 20 rats sur toute la durée du projet (5 ans). Une attention toute particulière sera faite sur les animaux vieillissants. Les animaux montrant une perte d'appétit, des difficultés locomotrices ou un isolement seront replacés dans des structures universitaires et euthanasiés pour dissection lors de travaux pratiques ou pour des prélèvements d'organes.

Les souris saines permettent de déterminer la faisabilité *in vivo* de nouvelles techniques d'acquisition et de publier dans des revues scientifiques le principe de la technique. Après avoir évalué et caractérisé les capacités des techniques de contrôle optimale, d'élastographie et de SRM en terme de sensibilité de détection, reproductibilité des mesures, nous serons à même de préparer une nouvelle demande d'autorisation pour travailler sur des animaux malades (e.g stéatose, fibrose et cirrhose, ou tumeurs) et d'estimer le nombre optimal d'animaux à utiliser. Les techniques pour l'aide au diagnostic que nous développons sont non invasives : applicables à terme aussi bien à l'homme qu'à l'animal, elles offrent une alternative à la biopsie pour laquelle les risques de complications et de souffrance devraient diminuer.

11474 Notre service met à disposition de l'instrumentation et expertise en cytométrie en flux, microscopie (confocal, multiphotonique et intravitale) et spectroscopie pour des projets de recherche de l'ensemble de la communauté scientifique. Parmi les technologies disponibles, la microscopie intravitale est unique car elle permet l'investigation des dynamiques cellulaires *in situ* chez l'animal anesthésié tout en préservant la physiologie du tissu. Cette technique est un atout majeur pour les projets de recherche des utilisateurs et nous souhaitons mettre en place les techniques chirurgicales nécessaires à la visualisation par microscopie intravitale de différents organes parfois peu accessibles comme le poumon et nœud lymphatique. Nous souhaitons proposer à la communauté scientifique un plateau d'imagerie *in vivo* chez la souris, en particulier pour la microscopie intravitale. Compte tenu de la technicité et des procédures requises à la fois pour l'imagerie intravitale notamment d'organes peu accessibles comme le poumon, doter notre service de cette possibilité offrirait de nombreux avantages aussi sur le plan de l'éthique animale. En effet, le plateau pourra se porter garant des procédures proposées sur le plateau et rendra accessible ces approches à des utilisateurs qui ne pourraient demander cette procédure en leur nom par manque d'expertise. Dans le cas de l'utilisation d'animaux des utilisateurs, le service réalisera les procédures seulement si le phénotype est non dommageable. Pour les animaux qui ont subi des traitements préalables légères/modérées ils doivent avoir recouvert une bonne santé. Si les animaux ont subi des procédures sévères, par exemple infection par *Mycobacterium tuberculosis*, les procédures seront effectuées à des stades où aucuns signes de souffrance ou douleur sont visibles sur les animaux. Dans le 2 cas, les animaux seront examinés par le vétérinaire responsable de l'animalerie de façon à attester de leur état de santé avant toute procédure.

Nous anticipons en première intention un nombre total de 685 animaux pour les projets des utilisateurs et la mise au point des techniques de microscopie intravitale. Le recours aux modèles murins suivra une démarche éthique stricte en employant des techniques chirurgicales, d'asepsie et d'anesthésie/analgésie adéquates pour minimiser toute angoisse et souffrance des animaux. Conformément aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, le nombre d'animaux utilisés dans le projet est réduit à son minimum pour obtenir dans chaque groupe étudié un nombre d'individus suffisants pour réaliser les tests statistiques. La standardisation des procédures offerte par le service permettra en outre de raffiner les procédures avec pour objectif une réduction du nombre d'animaux utilisés.

11475 Le lymphome folliculaire (LF) est un cancer des cellules immunitaires de type lymphocytes B. Il se développe au sein des ganglions lymphatiques mais aussi, dans près de 70% des cas, au niveau de la moelle osseuse. Cette pathologie, malgré des avancées thérapeutiques notables, reste à l'heure actuelle incurable et sa fréquence est en constante augmentation dans les pays

industrialisés. Les cellules tumorales de LF se caractérisent par l'accumulation d'altérations génétiques que les progrès récents du séquençage ont permis de préciser. Ces multiples anomalies permettent de favoriser la croissance tumorale et la résistance au traitement non seulement en agissant directement sur la survie, la prolifération, ou la différenciation des cellules tumorales mais aussi en favorisant le dialogue des cellules de LF avec les cellules qui l'entourent, aussi appelées cellules du microenvironnement ou niche tumorale. Ainsi des sous-types particuliers de cellules stromales, de macrophages et les lymphocytes T CD4 participent à la croissance tumorale. En particulier, les cellules stromales soutiennent directement la survie des cellules B tumorales et sont impliquées dans l'organisation de la niche pro-tumorale en recrutant et activant les autres cellules du microenvironnement. Cependant, l'absence de modèles *in vitro* et *in vivo* pertinents a limité, jusqu'à aujourd'hui, l'étude fine des interactions entre les cellules du microenvironnement et les lymphocytes B tumoraux dans ses dimensions spatiale, cinétique et moléculaire.

Parmi les modèles murins actuels mimant la translocation de Bcl2 au locus IgH (premier évènement oncogénique lors du FL), aucun ne reproduit fidèlement le développement du lymphome folliculaire. Notre objectif est d'étudier l'impact de mutations additionnelles sur la lymphomogénèse pour tenter de créer un modèle s'approchant au plus près de la pathologie humaine. Nous souhaitons donc croiser des souris chez lesquelles le gène Bcl2 est dérégulé avec des souris porteuses d'altérations : (1) affectant les lymphocytes B et fréquemment présentes chez les patients atteints de FL, (2) favorisant la croissance des cellules du microenvironnement, ou (3) entraînant l'exacerbation des réactions immunes favorisant la transformation des cellules malignes.

Sur l'ensemble des souris générées, nous analyserons le développement lymphocytaire B et la fonctionnalité de ces cellules (prolifération, apoptose, répertoire antigénique, capacité de réponse à une immunisation.), ainsi que la composition et la fonctionnalité du microenvironnement, tout en surveillant l'occurrence éventuelle de lymphoproliférations.

Ce projet utilise au total 500 souris.

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

Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier et le développement tumoral ainsi que l'étude du microenvironnement ne peuvent être reproduit en culture.

Réduire : le développement du LF n'est pas attendu chez toutes les souris. Pour se donner une chance d'avoir un nombre suffisant de données exploitables, des cohortes de 30 animaux seront utilisées.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, les animaux seront suivis quotidiennement et seront euthanasiés aux premiers signes de souffrance.

11476 Les cellules du système immunitaire jouent un rôle clé dans le contrôle de la progression tumorale et de la réponse aux traitements au cours des cancers. Parmi ces cellules, les macrophages représentent la population immunitaire majeure. Les macrophages peuvent changer de phénotype et de fonction selon les stades du développement tumoral. En effet, au cours de la progression tumorale, les macrophages basculent d'un phénotype anti-tumoral vers un phénotype favorisant la progression tumorale et les métastases. A ce stade tardif, les macrophages sont corrélés à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers et semblent ainsi représenter des cibles thérapeutiques intéressantes.

L'objectif de notre étude sera de mettre en évidence dans des modèles expérimentaux de cancers chez la souris, déjà décrits dans la littérature, les caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des macrophages au cours de la progression tumorale. Nous rechercherons alors l'effet de différents agents pharmacologiques pouvant moduler les fonctions des macrophages afin de favoriser l'élimination du cancer. Différents modèles de cancers (hématologique, ovarien, colorectal

et dermatologique) seront étudiés et nous permettront de comparer le rôle des macrophages et l'effet des traitements afin de proposer des thérapies ciblées selon le type de cancers.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet. L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptés à l'expérience et aux potentiels effets indésirables des procédures sur l'état de santé global des animaux. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal. Les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux en collectant le plus de données possibles. Les mécanismes impliqués dans le développement des cancers sont complexes. Ainsi, cette étude permettra d'étudier dans leur contexte physiopathologique les macrophages, cibles thérapeutiques potentielles, et ne peut pas être mimée par une approche de culture cellulaire. L'ensemble de cette étude comprendra 4032 souris.

11477 Les troubles de l'humeur (dépression, anxiété) sont un problème majeur de santé publique dont l'incidence augmente tout particulièrement en condition de stress chronique ou chez des patients atteints de maladies associées à une inflammation comme l'obésité. Ces derniers sont aussi plus souvent résistants aux traitements antidépresseurs classiques, ce qui aggrave d'autant plus la situation. Diverses données récentes suggèrent l'implication de processus inflammatoires dans le développement de symptômes dépressifs, ainsi que dans la résistance aux traitements antidépresseurs. Si cette implication est vérifiée, la possibilité de cibler l'inflammation pour améliorer la réponse aux traitements antidépresseurs constituerait une stratégie particulièrement pertinente pour mieux prendre en charge et traiter les troubles de l'humeur. Il apparaît donc important de caractériser plus spécifiquement les mécanismes contribuant à la résistance aux antidépresseurs et de vérifier en particulier le rôle de l'inflammation. Parmi les stratégies anti-inflammatoires possibles, les approches nutritionnelles sont particulièrement prometteuses, de par la capacité de certains nutriments à moduler le fonctionnement du système immunitaire. Dans ce contexte, le safran, dont les effets bénéfiques sur la santé et sur les troubles de l'humeur ont déjà été rapportés dans la littérature, constitue un candidat de premier ordre. Des études menées sur des modèles animaux de dépression ont également rapporté que des extraits de safran réduisent les changements comportementaux modélisant les symptômes de dépression et d'anxiété chez l'animal.

L'objectif de ce projet est double. Il s'agira tout d'abord d'identifier les mécanismes impliqués dans la résistance aux antidépresseurs dans deux modèles de souris chez lesquels des symptômes de dépression sont induits soit par l'exposition à une diète riche en lipides (modèle de dépression associée à une inflammation), soit par l'exposition à un stress chronique modéré (modèle de dépression non-inflammatoire). La comparaison de ces deux modèles permettra ainsi de vérifier si la présence d'une inflammation perturbe effectivement la réponse aux antidépresseurs. Nous pourrons alors évaluer l'impact de l'apport d'extraits de safran sur la réponse aux antidépresseurs. Pour cela, nous analyserons les effets d'un traitement antidépresseur et/ou des extraits de safran sur les comportements de types anxieux et dépressif dans ces deux modèles de dépression. Ces mesures comportementales s'accompagneront d'investigations biologiques au niveau sanguin et cérébral. Les résultats ainsi obtenus apporteront des données scientifiques très utiles pour une meilleure compréhension des mécanismes d'action des différents nutriments d'intérêt testés sur l'humeur.

Afin de déterminer la dose efficace d'antidépresseur et d'extraits de safran à utiliser chez la souris, ainsi que la voie d'administration optimale, une première étude sera réalisée dans laquelle nous comparerons les effets de différentes doses des produits testés, ainsi que ceux de plusieurs modes d'administration de safran. Nous aurons besoin pour cette étude de 156 animaux (13 groupes), qui nous permettront de définir toutes les conditions expérimentales à utiliser par la suite dans l'ensemble de nos expériences.

Compte-tenu des différents groupes d'étude nécessaires (16 groupes supplémentaires pour la seconde étude, cf annexe 4) et des contraintes expérimentales, nous aurons besoin de 348 souris (C57BL/6J) mâles au total. Ce calcul a été fait sur la base de 12 animaux par groupe, nombre

minimal requis afin d'atteindre une puissance statistique suffisante. En effet, il existe une grande variabilité interindividuelle et les évaluations comportementales chez les animaux sont influencées par de nombreux paramètres ce qui nous impose d'avoir un nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour garantir la robustesse de nos résultats, tout en nous restreignant à des effectifs les plus faibles possibles (Réduire). S'agissant de la mesure d'effets comportementaux, nous ne pouvons remplacer les animaux par d'autres techniques. Cependant, lorsque l'objectif le permettra, des études seront faites en culture cellulaire afin d'éviter l'utilisation d'animaux supplémentaires (Remplacer). Nous prenons enfin en compte le bien-être des animaux via l'enrichissement des cages avec des carrés de coton, des igloos en carton et des bâtons de bois et via la stabulation en cages collectives dès que possible afin de réduire le stress des animaux. Afin de réduire au maximum la souffrance causée aux animaux, nous avons déterminé avec attention les points limites du projet nous permettant, le cas échéant, d'administrer un traitement de confort aux animaux afin de prendre en charge la douleur si nécessaire, ou d'euthanasier des animaux si les points limites sont dépassés et que leur état ne s'améliore pas (Raffiner ; cf détails dans la suite de la demande). Ainsi, nous respectons l'obligation réglementaire des 3 R : Réduire, Remplacer et Raffiner.

11478 Les maladies cardiovasculaires sont responsables de 32% des décès dans le monde. La maladie des artères coronaires, qui irriguent le muscle cardiaque pour permettre sa contraction, représente la moitié des décès d'origine cardiovasculaire. La maladie coronaire se caractérise par un dépôt de lipides dans la paroi des gros vaisseaux coronaires, qui peut conduire, par obstacle à l'écoulement normal du flux sanguin, à l'angine de poitrine, voire à l'infarctus du myocarde. Cette atteinte des coronaires est aujourd'hui bien connue. La ramification des gros vaisseaux coronaires en artérioles puis en capillaires permet l'apport en sang à chaque cellule musculaire cardiaque. Des données récentes suggèrent qu'une atteinte de ces microvaisseaux précéderait l'atteinte des plus gros dans l'histoire de la maladie coronaire. Plus encore, la maladie coronaire microcirculatoire peut se développer et entraîner la survenue d'accidents cardiaques en l'absence de problèmes macrocirculatoires. Cependant, à l'inverse des macrovaisseaux, les techniques d'exploration de la microcirculation coronaire ne sont pas développées et disponibles en routine sur de grandes populations de patients, malgré l'intérêt clinique qu'il y aurait à mesurer l'intégrité de la microvasculature coronaire.

Nous avons développé une méthode de calcul de l'atteinte coronaire microcirculatoire à partir d'images scintigraphiques de la perfusion myocardique réalisées en tomographie par émission monophotonique (TEMP), une méthode d'imagerie courante en médecine nucléaire. Cette méthode consiste à quantifier l'hétérogénéité de la perfusion myocardique par une mesure de l'entropie des images obtenues en routine clinique. Les premiers résultats cliniques indiquent que les patients qui présentent une atteinte des microvaisseaux (entropie de perfusion élevée selon cette technique) ont plus de risque de subir un événement cardiovasculaire tel qu'un infarctus du myocarde par exemple. Cette méthode a été transposée avec succès au domaine préclinique dans un modèle expérimental de dysfonction coronaire microvasculaire induite par le diabète de type II chez le rat. Elle permettra l'étude des mécanismes physiopathologiques conduisant à la dysfonction microcirculatoire et de l'efficacité de nouveaux médicaments. Les études cliniques et précliniques ont été réalisées jusqu'à présent à partir d'images obtenues après injection du thallium-201, un excellent traceur de la perfusion myocardique. Cependant, les examens cliniques de la perfusion myocardique sont majoritairement réalisés en utilisant le ^{99m}Tc -SESTAMIBI, pour des raisons liées aux caractéristiques physiques de la désintégration radioactive du thallium-201 d'une part et du ^{99m}Tc d'autre part. La pertinence du ^{99m}Tc -SESTAMIBI pour la quantification de l'entropie de la perfusion myocardique doit donc maintenant être évaluée.

L'objectif de ce projet consiste donc en la comparaison des capacités du thallium-201 et du ^{99m}Tc -SESTAMIBI pour la quantification de l'entropie de la perfusion myocardique, en évaluant la pertinence des deux traceurs au regard de paramètres histologiques et immunohistologiques accessibles uniquement sur un modèle expérimental car nécessitant des prélèvements de tissus post-mortem après l'acquisition des images scintigraphiques utilisées pour la quantification de l'entropie de la perfusion. Au total 48 rats seront utilisés, répartis en 4 groupes expérimentaux. Il

s'agit du minimum d'animaux nécessaires afin de pouvoir obtenir un échantillon de données exploitables statistiquement. Le remplacement de ce protocole *in vivo* par des expériences *in vitro* n'est pas possible compte-tenu du fait que le phénomène étudié – la dysfonction coronaire microvasculaire, est causé par des phénomènes métaboliques et inflammatoires complexes qui surviennent dans le contexte d'un organisme vivant et qu'il est à l'heure actuelle impossible de réduire à des systèmes d'études plus simples. Les animaux seront hébergés par deux, en cages avec enrichissement du milieu de vie. Ils seront suivis bi-quotidiennement afin de contrôler leur bien-être. L'utilisation de streptozotocine associée ou non à un régime alimentaire particulier enrichi en lipides mis en œuvre dans cette étude entraînera un ralentissement de la prise de poids voire une perte de masse corporelle. La mise en place de points limites adaptés permettra de limiter la souffrance de ces animaux. Les injections seront réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires. Une anesthésie gazeuse sera utilisée pour effectuer les acquisitions scintigraphiques afin de rendre la procédure totalement indolore pour les animaux.

11479 Les maladies auto-immunes sont un groupe de pathologies qui touchent 5% de la population des pays occidentaux. Elles sont dues à une dérégulation du système immunitaire qui s'attaque aux biomolécules du corps humain de manière inexpliquée. Bien que ces pathologies (le diabète, la sclérose en plaque) soient différentes par les organes touchés, les thérapies utilisées et la cinétique d'évolution, le microbiote semble jouer un rôle important dans leur développement.

La myasthénie gravis (MG) est une maladie auto-immune touchant les muscles striés squelettiques. Elle est caractérisée par une attaque de la jonction neuromusculaire postsynaptique par des anticorps dirigés notamment contre les récepteurs à l'acétylcholine. Il en résulte une faiblesse musculaire fluctuante et une fatigabilité excessive. Le pronostic vital du patient peut être engagé si les muscles respiratoires sont touchés. A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif pour la MG. Les traitements thérapeutiques actuels sont essentiellement symptomatiques ou non spécifiques. De plus, ils doivent être pris à vie. La prise d'antibiotiques qui modifient le microbiote intestinal induit une aggravation de l'état clinique des patients MG.

Notre projet a pour but de comprendre l'impact du microbiote intestinal sur les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de la myasthénie gravis, pour améliorer la prise en charge des patients myasthéniques.

Dans ce projet, d'une durée de 5 ans, nous utiliserons le modèle expérimental classique de MG qui consiste à immuniser les souris avec le récepteur à l'acétylcholine. Nous utiliserons 144 souris. Toute la démarche scientifique a été établie afin de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) et obtenir des résultats statistiquement pertinents avec le minimum d'animaux possible.

Cette analyse *in vivo* ne peut être remplacée par des études conduites *in vitro* du fait de l'absence de modèle cellulaire *in vitro* reproduisant simultanément l'intestin, le thymus et la jonction nerf/muscle. Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place de points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des souris. Ainsi, toutes les dispositions visant à prévenir le stress et la douleur seront prises en compte et en charge par un suivi quotidien des animaux.

11480 Le bisphénol A (BPA), reconnu comme perturbateur endocrinien, est un plastifiant utilisé afin de produire des contenants alimentaires dans l'industrie agro-alimentaire, et a des effets délétères sur la fonction reproductive (hypothalamus et gonades) des mâles et des femelles, ayant entraîné l'interdiction de son utilisation en France dans l'industrie agro-alimentaire. C'est pourquoi de nouveaux analogues du BPA, dont le bisphenol S (BPS), ont émergé afin de remplacer le BPA. Il est donc important d'étudier les effets du BPS chez l'humain, notamment avant que l'exposition environnementale du BPS augmente, les premières données obtenues suggérant que les 2 molécules (BPA et BPS) ont des effets similaires. Etant donné qu'il est difficile de réaliser une étude chez l'humain, le modèle brebis a été retenu. En effet ce modèle animal présente une plus grande proximité physiologique avec l'espèce humaine en terme de reproduction (durée du cycle œstral, durée de gestation, nombre d'ovulation) par rapport aux modèles rongeurs classiquement utilisés. Les cellules de rongeurs sont par ailleurs plus résistantes aux bisphénols (de 10 à 100 fois) par rapport aux cellules humaines. Ce projet vise à étudier comment le bisphénol S peut affecter la

reproduction chez la brebis et à étudier les interactions avec le statut métabolique de l'individu. En effet, les perturbateurs endocriniens étant majoritairement solubles dans les graisses, la question de leur accumulation dans le tissu adipeux gras reste à explorer. Ce projet consistera à exposer 2 lots de brebis, se différenciant par leur état d'engraissement (« maigres » versus « grasses »), avec 3 doses différentes de bisphénol S (0, 5 ou 50 µg/kg/jour) pendant 3 mois, via leur alimentation, puis à réaliser 2 sessions/brebis de ponction de follicules ovariens réalisées par endoscopie afin de mesurer l'impact de l'exposition au bisphénol S sur la qualité de l'ovocyte.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacement : pour comprendre les effets d'une exposition prolongée au bisphénol S chez l'humain, le recours à une espèce animale est nécessaire. Le modèle ovin a été retenu, car il ne présente pas de résistance naturelle à ce composé, contrairement au modèle rongeurs.

Raffinement : les brebis utilisées dans ce projet (6 groupes de 20 brebis) seront placées sous surveillance quotidienne (activité, comportement) et hébergées dans une bergerie avec aire paillée intégrale, facilité d'accès à la nourriture et à l'eau et répondant aux normes d'élevage chez cette espèce. Les animaux seront maintenus en groupes sociaux stables. Les déplacements se feront dans le calme. Les mises à jeun avant endoscopies seront limitées à 24H avec accès à l'eau jusqu'à la veille au soir de l'intervention. De plus, des traitements anesthésiques, analgésiques et anti-inflammatoires seront réalisés lors des ponctions folliculaires réalisées par endoscopie.

Réduction : le protocole expérimental permet de réduire au maximum le nombre de brebis utilisées en répétant les procédures expérimentales sur les mêmes individus. Six lots de 20 brebis sont nécessaires pour évaluer de façon croisée les effets de l'exposition au bisphénol S (à trois doses différentes) sur la qualité ovocytaire d'une part et l'impact de l'état d'engraissement de l'individu d'autre part. Un total de 120 brebis seront donc utilisées dans ce projet.

11481 Ce projet explore la piste des origines gestuelles de la parole. Et si la communication gestuelle était centrale dans l'origine et l'organisation cérébrale du langage dominé par l'hémisphère gauche ? Cette hypothèse gagne du terrain à la lumière des liens étroits mis en évidence non seulement entre les gestes et le langage dans l'espèce humaine mais aussi entre les gestes de nos cousins les primates et certaines propriétés du langage. Au regard de leur proximité phylogénétique, seule une perspective comparative entre primates humains et non humains peut nous aider à déterminer les continuités entre la latéralisation des gestes des primates et celle du langage humain. A la croisée de l'éthologie, de la psychologie comparée et des neurosciences non invasives, ces recherches seront menées sur les babouins hébergés en captivité en groupes sociaux et porteront (1) sur le développement longitudinal de gestes communicatifs (et signaux vocaux) au sein du groupe social de babouins olives *Papio anubis*, leurs asymétries et leur spécialisation hémisphérique anatomique (via IRM) auprès de 30 babouins depuis la naissance jusqu'à la maturité sexuelle en comparaison avec un groupe indépendant de 26 babouins de Guinée *Papio papio* pour lequel une base de données de performances cognitives est disponible ; (2) sur l'héritabilité parents/enfants de ces asymétries manuelles et cérébrales soit 40 parents à scanner ; (3) sur les asymétries cérébrales fonctionnelles des gestes et des vocalisations mesurées par imagerie optique (fNIRS) auprès de 8 sujets entraînés *Papio anubis*. Tous les sujets, dont la taille optimale d'échantillon a été évaluée, sont observés dans leur groupe social respectif et ne sont mobilisés que temporairement au cours du projet sur 5 ans lors de la pose du serre-tête de l'appareil fNIRS ou lors d'acquisitions d'images IRM, et ce, sous anesthésie avant d'être remis dans leur groupe social après le réveil. Des points limites sont définis pour éviter toute souffrance potentielle.

11482 La polyarthrite rhumatoïde est la plus fréquente des maladies auto-immunes et des rhumatismes inflammatoires affectant 1 % de la population française. Elle est caractérisée par une inflammation chronique et une destruction articulaire et est responsable d'une perte de mobilité, d'un handicap et d'une augmentation de la mortalité de l'ordre de 50 % principalement d'origine cardiovasculaire. Du fait de l'inflammation, de la diminution d'activité physique et de mobilité liée au handicap, une diminution de la masse musculaire muscle et une augmentation de masse grasse surviennent au

cours de la maladie et peuvent contribuer au développement de maladies cardiovasculaires ou métaboliques telles que des infarctus de myocarde ou un diabète. Les traitements classiques restent partiellement efficaces. Nous avons démontré au cours du vieillissement et chez les patients obèses, que l'accumulation de lipides en dehors des tissus graisseux habituels, et en particulier dans le muscle était délétère en favorisant la perte de muscles et leur mauvais fonctionnement, et nous cherchons à déterminer si cette accumulation de lipides est présente dans le cadre de la polyarthrite rhumatoïde. La toxicité de certains lipides, l'inflammation et les événements cardiovasculaires peuvent être limités par une alimentation enrichie en acides gras polyinsaturés n-3 (oméga-3), suggérant que ceux-ci pourraient avoir un effet bénéfique en plus des traitements classiques sur le muscle en situation de polyarthrite.

Des résultats préliminaires obtenus chez le rat montrent une association entre la constitution de ces dépôts lipidiques dans le muscle et la perte de masse musculaire lorsqu'il y a une inflammation articulaire. Nous émettons l'hypothèse que l'identification de marqueurs sanguins des atteintes musculaires permettra d'identifier précocement des patients les plus à risque de perdre leurs capacités musculaires, et ainsi d'améliorer leur prise en charge en partie via une intervention nutritionnelle qui cible à la fois l'inflammation liée à la maladie et les atteintes musculaires afin de préserver la mobilité et la qualité de vie des individus.

Le volet *in vivo* de ce projet sera conduit sur un modèle de polyarthrite induite par injection de collagène de type II bovin chez des rats femelles Wistar ou Lewis (CIA) hébergés dans des conditions adaptées à l'espèce dans un environnement enrichi. Ces deux souches sont décrites comme sensibles au traitement avec toutefois des variations selon l'installation expérimentale. Nous devons tout d'abord réaliser une mise au point du protocole afin de familiariser l'expérimentateur à la technique et de définir la souche qui répondra le plus efficacement au traitement. L'induction de la polyarthrite durera 4 semaines au total. Suite à une semaine d'acclimatation, l'arthrite sera induite une première fois par une injection intradermique de collagène de type II, suivie par une seconde immunisation 7 jours plus tard afin d'accroître l'atteinte sur 15 rats par souche, par comparaison à des rats témoins recevant une injection du véhicule soit 60 rats au total. Trois semaines plus tard, les animaux seront euthanasiés afin de recueillir le sang, le tissu adipeux et les tissus musculaires des pattes arrières.

Nous envisageons par la suite une étude de l'impact d'un traitement de référence associé ou non à une supplémentation en acides gras oméga 3 sur le développement de la pathologie et des atteintes musculaires sur une autre série d'animaux de la souche la plus sensible à l'induction de la polyarthrite dans un contexte d'alimentation de type occidentale. 5 groupes de 15 rats chacun, soit 75 rats au total, seront soumis à un régime riche en lipides et en sucres (WD). La polyarthrite rhumatoïde sera induite sur 4 groupes de 15 rats chacun, soit 60 rats au total. Un des 4 groupes induits, soit 15 rats, sera simplement soumis à ce régime (CIA+WD), tandis qu'un autre de ces groupes, soit 15 rats, sera aussi supplémenté en acides gras oméga 3 (CIA+WD+DHA). Les 2 autres de ces groupes, soit 30 rats au total, seront traités avec un traitement de référence utilisé en clinique (anti-TNF) associé ou non à une supplémentation en oméga 3 (CIA+WD+anti-TNF et CIA+WD+DHA+anti-TNF). Ces animaux seront comparés à un groupe de 15 rats sous régime occidental (WD). Les 75 animaux bénéficieront d'une semaine d'acclimatation à l'animalerie ainsi que d'une semaine d'acclimatation au régime occidental avant de procéder à l'induction de la polyarthrite.

L'ensemble de ce projet sera réalisé sur 60 rats pour la mise au point et 75 rats pour l'étude, soit 135 rats au total.

L'ensemble de cette démarche suit la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire pour pouvoir observer des différences statistiques pour les différents paramètres qui seront évalués et la mise au point prévue permettra probablement d'optimiser les résultats des procédures expérimentales et donc de limiter encore le nombre d'animaux utilisés par la suite. Les procédures expérimentales ont été pensées afin de réduire au maximum la douleur, l'anxiété ou le stress et de préserver le bien-être animal. Tout au long de l'expérimentation, une surveillance quotidienne sera mise en place pour détecter, réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'anxiété subie par les animaux. De plus, le

modèle animal ne peut être remplacé par une expérience *in vitro* car la sévérité de l'arthrite et la masse musculaire sont deux points clés qui seront étudiés au cours de cette expérience et ne peuvent être observés *in vitro*. Ce modèle d'étude permet d'appréhender le développement de la pathologie arthritique et sa potentielle modulation par l'alimentation, ce qui n'est possible que sur un organisme vivant pris dans sa globalité.

11483 Contexte : En France, l'infarctus du myocarde touche 100.000 personnes par an. C'est une maladie grave et invalidante provoquée par l'occlusion d'une artère coronaire. Le seul traitement possible est de déboucher l'artère occluse. Bien que bénéfique, cela provoque également des lésions supplémentaires incluant la mort des cellules du cœur et une dysfonction cardiaque. Comprendre les mécanismes sous-jacents constitue donc un grand challenge pour les scientifiques. Au cours des dernières décennies, la prise en charge des patients souffrant d'un infarctus a commencé à s'améliorer, grâce à la meilleure compréhension des mécanismes des lésions d'ischémie-reperfusion, en parallèle du développement de stratégies de cardioprotection. Néanmoins, l'infarctus myocardique reste une maladie fréquente avec un devenir incertain, ce qui confirme la nécessité de constantes recherches pour mieux cibler les solutions thérapeutiques.

Objectifs : Dans la cellule du cœur, les sphingolipides sont des lipides complexes qui transmettent des signaux et qui semblent pouvoir jouer un rôle au cours de l'infarctus du myocarde, notamment en favorisant la mort des cellules du cœur. Notre projet a pour objectif général de mieux comprendre le rôle des sphingolipides et notamment leur régulation au cours de l'ischémie-reperfusion et de proposer une nouvelle stratégie de cardioprotection via leur modulation. Nous travaillerons avec un modèle murin d'ischémie-reperfusion cardiaque : il s'agit d'un modèle préclinique de référence de l'infarctus du myocarde largement utilisé dans la littérature et maîtrisé par notre laboratoire. Nous étudierons ainsi l'effet de la modulation de la synthèse des sphingolipides (avec un activateur et un inhibiteur) au cours de l'ischémie-reperfusion cardiaque sur la taille d'infarctus et la fonction contractile chez la souris après ischémie-reperfusion cardiaque. Nous déterminerons les mécanismes sous-jacents par analyse de la composition des lipides dans le cœur et de sa structure. Ce projet comporte donc 1 procédure pour un total maximum de 119 souris sur 3 ans.

Conformité de la règle des 3R :

Remplacement : Notre projet fait suite à des études préliminaires *in vitro* et a donc pour but de les confirmer dans la pathologie de l'infarctus du myocarde, en utilisant un modèle *in vivo*.

Réduction : Le nombre d'animaux de cette procédure a été calculé à l'aide d'un logiciel de statistiques afin de déterminer le plus précisément possible le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, soit au maximum 119 animaux sur 3 ans.

Raffiner : Dans le but d'améliorer le bien-être des animaux et ce, dès leur arrivée dans notre animalerie, un enrichissement de milieu est mis en place et renouvelé très régulièrement aussi bien avant l'expérimentation qu'en soins post-opératoires. Afin de supprimer la souffrance et la douleur, la chirurgie est entièrement réalisée sous anesthésie générale avec prémédication analgésique et anesthésique locale adaptée. En soins post-opératoires, nourriture et boisson sous forme gélifiée seront mises à disposition de l'animal en plus de la nourriture et boisson habituelles, les groupes sociaux seront conservés et un protocole analgésique continu sera mis en place. De plus, un suivi de chaque animal sera assuré pour veiller à son bien-être.

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

11484 Les immunoglobulines intraveineuses (IgIV) font partie de l'arsenal thérapeutique d'une grande variété de pathologies auto-immunes et/ou systémiques. Le purpura thrombopénique immunologique (PTI) est l'une des pathologies dans lesquelles les IgIV sont largement utilisées. Le PTI est une maladie du sang qui se traduit par une baisse anormale du taux de plaquettes. Plusieurs études ont montré une augmentation du taux de plaquettes suite à l'administration d'IgIV.

Cependant les mécanismes d'action des IgIV permettant l'augmentation du taux de plaquettes ne sont pas élucidés. Les observations faites chez les modèles expérimentaux et chez les patients traités avec les IgIV suggèrent que les IgIV exercent leurs effets thérapeutiques en ciblant les cellules de l'immunité innée et adaptative, en inhibant leur activation et la sécrétion de médiateurs de l'inflammation.

Notre hypothèse de travail est que l'efficacité thérapeutique des IgIV dans le traitement du PTI serait liée à une augmentation des taux sériques de cytokine interleukine 11 (IL-11) induite par les IgIV. Cette cytokine exerce des effets immunomodulateurs, et stimule la mégacaryopoïèse (phénomène à l'origine de la génération des plaquettes sanguines) et l'hémostase primaire (premières étapes de l'arrêt d'un saignement). Au cours de ce projet, nous aimerions évaluer dans des modèles précliniques de PTI induits chez des souris sauvages et déficientes en l'IL-11 ou son récepteur, les taux de plaquettes circulantes, de facteur von willebrand (FvW), de facteur VIII et de cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires avant et au cours du traitement avec les IgIV.

Du point de vue scientifique, les données de cette étude seraient une importante contribution à la compréhension des mécanismes d'actions des IgIV.

Pour ce projet d'une durée de 2 ans, nous prévoyons d'utiliser 205 souris au total.

Nous avons strictement suivi le principe des 3 R durant la conception de ce protocole. Actuellement, les expériences sur les modèles précliniques du PTI sont le seul moyen de déterminer si l'effet des IgIV est médié par l'IL-11 (puisque les modèles déficients pour l'IL-11 ou son récepteur sont nécessaires pour résoudre cette question). Néanmoins, nous utiliserons le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. L'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les souris seront observées quotidiennement pour rechercher d'éventuels signes de mauvaise tolérance clinique de PTI. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum* ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et de tunnels en cartons).

11485 Un équilibre entre l'excitation et l'inhibition est requis pour assurer les fonctions normales du cerveau. Plusieurs maladies neurologiques et psychiatriques sont associées à une altération de cet équilibre dans le cerveau. Tel est le cas de plusieurs formes d'épilepsie pharmaco-résistantes. Comprendre les mécanismes impliqués dans le maintien de cet équilibre permettra de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de prévenir ou de traiter ces formes d'épilepsie ainsi des maladies psychiatriques comme l'autisme et la schizophrénie.

On sait que le maintien de l'inhibition est dû en grande partie à l'activité des transporteurs KCC2 et NKCC1 à la surface des neurones. Plusieurs études ont montré une corrélation entre une altération du nombre de ces transporteurs stabilisés à la surface des neurones et l'émergence des crises d'épilepsie. Il est donc crucial d'identifier les mécanismes qui contrôlent la stabilité de ces transporteurs afin de développer à terme de nouvelles cibles thérapeutiques contre l'épilepsie et certaines maladies psychiatriques.

Le laboratoire a récemment montré, *in vitro*, dans un modèle de neurones en culture, un nouveau mécanisme de régulation des transporteurs KCC2 et NKCC1 à la surface des neurones. Celui-ci implique les protéines WNK, SPAK et OSR1. Ces résultats nous ont permis de proposer que le blocage de ces protéines empêcherait l'apparition des crises d'épilepsie en prévenant les altérations de l'expression des transporteurs KCC2 et NKCC1 à la surface des neurones. Après avoir accumulé un grand nombre de preuves *in vitro*, il s'agit maintenant de valider notre hypothèse *in vivo*, dans un modèle de souris C57bl6 pour lequel un maximum de 778 animaux seront utilisés dans ce projet. En effet, l'importance de mécanisme ne peut être étudié qu'*in vivo* dans un réseau neuronal intègre afin de tester l'impact d'un blocage de ces protéines sur l'apparition et la sévérité des crises d'épilepsie. Le nombre d'animaux a été estimé au plus juste afin de limiter le nombre total d'animaux mis en œuvre tout en permettant d'assurer une puissance statistique acceptable pour nos expériences. Dans certaines expériences nécessitant une chirurgie, dont la douleur post-opératoire

est de courte durée, un analgésique sera administré en sous-cutané en post-opératoire afin de minimiser l'inconfort de l'animal.

Notre projet aidera à découvrir des stratégies thérapeutiques novatrices et prometteuses pour le traitement de plusieurs formes d'épilepsie.

11486 L'obésité et ses complications représentent un problème de santé publique croissant dans notre société. Une meilleure compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, et plus largement du métabolisme énergétique, devrait nous permettre de mieux appréhender cette pathologie. Ce nouveau savoir pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique, ou d'établir de nouvelles recommandations nutritionnelles afin de mieux prendre en charge cette maladie. Le projet MiKa consiste à étudier le fonctionnement cérébral et vise à déterminer comment sont intégrés les différents signaux endogènes métaboliques et sensoriels impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Au cours de ce projet, nous verrons si un dysfonctionnement affectant l'intégration de ces signaux pourrait être un facteur à risque d'obésité. Ces études seront menées chez la souris (*mus musculus*), et nécessiteront 420 animaux.

L'étude MiKa nécessite l'utilisation de modèles expérimentaux vivants, et ce projet respecte le principe des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) appliqué en recherche animale. En effet, il n'existe pas actuellement de méthodes ou de modèles de substitution permettant d'étudier l'équilibre énergétique et le dialogue inter-organes d'un point de vue intégré, or le projet MiKa vise précisément à explorer la communication de l'axe intestin-cerveau. De plus, les réponses comportementales autonomes et les sensations de faim et de satiété que nous souhaitons étudier représentent des paramètres complexes qui ne sont pas modélisables *in vitro* ou *in silico*. Par ailleurs, des euthanasies sont nécessaires afin d'obtenir des biopsies cérébrales pour y explorer la connectivité des cellules cérébrales en fonction des aliments ingérés. En effet, les techniques d'imagerie non invasive actuelles ne sont pas assez résolutive pour apprécier des changements d'interaction cellulaires dans le cerveau. Ainsi le projet MiKa sera réalisé chez la souris (*mus musculus*), qui constitue un modèle de référence pour les études métaboliques et neurophysiologiques. Cet animal nous permet d'obtenir des analyses fines du comportement alimentaire. Sa taille est compatible avec la dissection des aires cérébrales permettant des analyses ultrastructurales en microscopie. De plus, la réalisation de différents tests fonctionnels permettant l'analyse des performances métaboliques (test de tolérance au glucose) est aussi possible chez cet animal du fait des nombreuses similarités physiologiques qui existent avec le métabolisme de l'Homme. Comme le projet MiKa s'inscrit dans les perspectives d'un précédent projet, les procédures décrites dans ce nouveau projet, ainsi que la stratégie expérimentale ont été optimisées, standardisées et validées précédemment, ce qui évite des études pilotes supplémentaires et réduit les effectifs nécessaires au projet. Cela permet également de déterminer le nombre d'animaux nécessaires et suffisants pour mener l'étude MiKa qui s'élève à 420 animaux. Un suivi quotidien sera fait pour s'assurer du bien-être des animaux et des soins vétérinaires peuvent être donnés au besoin. Les animaux seront élevés dans un environnement enrichi permettant l'expression de comportements innés et favorisant la protection des animaux. Ce raffinement contribue au bien-être animal, ce qui réduit la variabilité inter-individuelle engendrée par le stress, et par conséquent limite le nombre d'individus nécessaires pour les études statistiques.

11487 La détérioration de l'environnement constitue sur le long terme, un facteur de déclenchement et d'aggravation des maladies cardiovasculaires et respiratoires les plus fréquentes, comme la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO). La BPCO est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes qui aboutit à une détérioration progressive de la fonction respiratoire. L'évolution de cette pathologie est ponctuée de périodes d'exacerbations dues à des infections bactériennes ou virales. Elle est responsable d'une morbi-mortalité importante puisqu'elle représentera la 3^e cause de mortalité et la 5^e cause de handicap dans le monde en 2020. Ceci en fait un problème majeur de santé publique. Cependant, aucun traitement de la BPCO n'est actuellement disponible, seuls les symptômes associés à la pathologie peuvent être soulagés.

En reproduisant les pathologies humaines dans un modèle expérimental murin, nous pouvons mieux étudier les mécanismes physiopathologiques afin de proposer des thérapies efficaces. Des souris seront quotidiennement exposées à la fumée de cigarette jusqu'à ce que ces souris présentent les principaux symptômes de la BPCO, puis elles seront exposées aux agents pathogènes respiratoires *Streptococcus pneumoniae*, et *Haemophilus influenzae* non typable (NTHi), afin de mimer une période d'exacerbation de la BPCO. L'impact sur le système immunitaire inné et sur le développement de l'inflammation pulmonaire sera étudié pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Des animaux sauvages, ainsi que des souris déficientes en cellules/molécules d'intérêt, seront utilisés.

Nos objectifs sont donc multiples :

- 1- Reproduire la pathologie chez la souris (BPCO à l'état stable et en phase d'exacerbation),
- 2- Explorer les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la BPCO et identifier des cibles thérapeutiques potentielles,
- 3- développer des stratégies d'intervention pour restaurer une immunité compétente chez la souris BPCO et limiter la progression des lésions associées.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir remplacement, réduction et raffinement. Au total, 5160 souris sont nécessaires pour atteindre nos différents objectifs. Cette utilisation maximise les données obtenues à partir de chaque animal, afin de limiter ou d'éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Si nécessaire, des modifications des procédures sont prévues au cours des expérimentations afin de réduire la douleur et la détresse ainsi que d'améliorer le bien-être des animaux. Tout signe éventuel de détresse (prostration, vocalisation, tremblement, ...) fera l'objet d'une attention particulière. Il est primordial de prévenir les signes de douleur et de détresse, de les reconnaître, de les surveiller pour décider de l'issue de l'expérimentation.

11488 Les maladies infectieuses restent une cause majeure de mortalité, en particulier les infections à tropisme respiratoire. La compréhension de la relation hôte microorganisme est nécessaire pour envisager de nouvelles approches thérapeutiques, en particulier immuno-thérapeutiques. Les traitements antibiotiques ont jusqu'à aujourd'hui été étudié sans tenir du contexte immunitaire. L'efficacité de l'antibiothérapie est cependant corrélée à la compétence immunitaire. La connaissance des mécanismes immunologiques précoces (innés) lors des traitements antibiotiques d'une infection microbienne doit permettre d'envisager des approches antibactériennes innovantes. L'objectif de ce projet consiste à caractériser les mécanismes immunitaires innés mis en œuvre dans l'animal lors du traitement avec des antibiotiques des infections afin de définir des bases moléculaires et cellulaires pouvant contribuer à l'efficacité des antibiotiques.

La complexité du processus infectieux et de la réponse immunitaire associée ne peut être reproduite uniquement dans des tests *in vitro*. Pour ces raisons, nos investigations nécessitent des tests chez l'animal, plus particulièrement chez la souris. Le modèle murin est à ce jour le plus pertinent pour caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires de la réponse anti-infectieuse respiratoire. En effet, de nombreux modèles de souris invalidées pour des gènes des cascades immunologiques sont disponibles et permettent de caractériser précisément les mécanismes immunitaires anti-infectieux. Enfin, l'immunité innée qui est ciblée dans notre projet est très conservée entre les mammifères. Ainsi les réponses obtenues dans le modèle préclinique murin pourront être extrapolées à l'humain et permettront peut-être d'envisager le transfert rapide de ces approches antibactériennes chez l'homme.

Ce projet suivra les exigences de remplacement, de réduction, et de raffinement. Ainsi, des analyses statistiques seront effectuées en amont des infections expérimentales pour définir le nombre optimal de souris pour obtenir une puissance statistique suffisante. Par ailleurs, des analyses multiparamétriques et à haut débit (analyse de l'expression génique par puces à ADN, PCR haut débit, ou dosages multi-cytokines) permettront d'obtenir le maximum de données exploitables par animal et ainsi de limiter le nombre utilisé. Les expériences seront généralement composées de 3 groupes de souris infectées (contrôles et traitement antibiotique optimal et

traitement antibiotique à dose modérée) et des échantillonnages à différents temps post-traitement. Pour les expériences d'efficacité des traitements, 8 souris par groupes seront nécessaires alors que 5 souris par groupe seront utilisées pour les analyses multiparamétriques de l'immunité pour un total de 3120 souris. Alors que les infections vont induire un degré d'altération sévère chez l'animal, les doses, les voies d'administration et les durées de traitements utilisés n'induisent pas de douleur (sévérité légère à modérée sous sédation si nécessaire). Les traitements participent surtout à l'élimination du pathogène et à l'amélioration significative de l'état général des animaux, et modélisent avant tout les interventions qui pourraient être réalisés chez l'homme. De plus, les animaux seront anesthésiés durant les manipulations pour réduire toute douleur et anxiété. Enfin, une attention toute particulière sera portée sur l'état global des animaux au cours de l'infection. Un point limite sera défini en fonction des paramètres physiques, physiologiques et cliniques et permettra de limiter au maximum la souffrance des animaux.

11489 Certaines cellules du système immunitaire peuvent aider à lutter contre le cancer alors que d'autres en favorisent la progression. Parmi ces cellules, notre étude se focalise sur les lymphocytes Th17 qui peuvent avoir un rôle ambivalent. En effet, dans certains contextes, les Th17 peuvent aider l'organisme à lutter contre la tumeur (nommés Th17anti le reste du document) et dans d'autres cas, ils deviennent l'allier de la tumeur et l'aident à progresser (Th17pro). Nous avons identifié une molécule (NLRP3) qui pourrait être utilisée comme une cible thérapeutique pour transformer les Th17pro en Th17anti.

Le système immunitaire est un système complexe qui est largement influencé par les interactions physiques et chimiques qu'il établit avec les autres cellules de l'organisme. C'est pourquoi il est essentiel d'étudier les cellules immunitaires dans un animal entier. Pour évaluer la pertinence de nos observations *in vitro* nous avons généré des souris génétiquement modifiées déficientes pour notre molécule d'intérêt. Nous allons étudier si les tumeurs que nous injectons poussent moins vite dans ces souris dans 2 modèles : tumeurs sous cutanées et tumeurs pulmonaires. En effet, le recrutement des globules blancs est différent selon le site de la tumeur. Pour comprendre si les observations obtenues *in vitro* sont vraies *in vivo*, nous euthanasierons ces souris et étudierons leurs Th17 mais aussi les autres globules blancs pour savoir si d'autres modifications sont associées.

Pour déterminer le potentiel anti tumoral des cellules Th17pro déficientes pour NLRP3, nous essaierons de soigner des souris par thérapie cellulaire. Nous injecterons des cellules Th17pro déficientes pour la molécule, générées en laboratoire à des souris porteuses de tumeurs et nous évaluerons l'impact sur la progression tumorale. Pour comprendre les mécanismes, nous utiliserons des anticorps bloquants les différentes molécules en relation avec les Th17 pour savoir laquelle est impliquée.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront répétées que deux fois et les rates et les tumeurs seront analysées sur les mêmes animaux ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. De plus, nous avons fait appel à une méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants. Des études préliminaires ont été réalisées sur les cultures de cellules *in vitro* limitant ainsi l'utilisation d'animaux (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections sous-cutanées des tumeurs et euthanasie) sera réalisée sous anesthésie permettant ainsi le raffinement de l'étude. Les animaux porteurs de tumeurs sont observés au minimum trois fois par semaine et leur état clinique évalué. Les animaux présentant des signes de douleur ou de souffrance, sont suivis quotidiennement et euthanasiés au plus tard aux points limites. Cette étude nécessitera 2093 souris.

11490 L'inhibition de la retinaldehyde dehydrogenase 1 (Raldh1), une enzyme impliquée dans le métabolisme des aldéhydes et de la vitamine A, est un facteur causal de la maladie de Parkinson (MP) chez l'homme. En accord avec ces données cliniques, les souris présentant une inactivation

génétique de Raldh1 (Raldh1KO) développent les troubles moteurs pendant le vieillissement. Nous allons :

(i) identifier les mécanismes impliqués dans le processus de neurodégénérescence chez les souris Raldh1KO,

(ii) tester des méthodes de prévention du développement de la neurodégénérescence.

Pour tester les mécanismes et la progression de la neurodégénérescence des voies dopaminergiques associée à l'inactivation génétique de l'enzyme Raldh1 il n'est pas possible de remplacer les modèles murins par un autre modèle animal ou des modèles purement *in vitro* dans cette étude car il faut étudier les réseaux neuronaux dans leur ensemble.

Dans l'objectif de raffinement nous allons utiliser des approches pharmacologiques avec des doses de neurotoxines faibles pouvant révéler le dysfonctionnement par la sensibilité accrue à la neurodégénérescence dans nos modèles murins. Au cas où une infection serait détectée suite à la chirurgie, un traitement par Synulox (amoxicilline + acide clavulanique) et/ou un traitement analgésique (Buprénorphine à 0.1mg/kg, injection sous-cutané) seront mis en place.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans cette étude nous avons déjà effectué des études *in vitro* de la toxicité neuronale de composées utilisées dans cette étude ce qui permettra de mieux cibler les doses actives des produits.

Au total 342 souris seront utilisées dans ce projet.

11491 Nous proposons chaque année deux formations ayant trait à la microscopie de fluorescence sur le vivant.

L'objectif de la première formation est de donner aux participants les bases théoriques et pratiques sur la microscopie de fluorescence et de leur faire connaître les avantages et les limites des divers systèmes d'acquisition d'images en microscopie.

Nous assurons des cours théoriques ainsi que des travaux pratiques parmi lesquels un cours et un TP sur l'imagerie intravitale et l'imagerie non invasive du petit animal.

Nous insistons sur les notions de base requises pour acquérir et analyser des images dans les meilleures conditions possibles afin de permettre le raffinement des expériences et envisager des modalités d'imagerie pour diminuer le nombre d'animaux lors de suivi de traitement.

La deuxième formation est davantage focalisée sur l'imagerie multiphotonique intravitale et a pour objectif de donner aux participants les outils nécessaires à l'élaboration d'expérimentations et à l'acquisition d'images sur animal anesthésié par cette technique. De même que pour la première formation, nous proposons un cours et un TP sur l'imagerie intravitale mais uniquement par microscopie multiphotonique. Dans ces TP, nous souhaitons montrer comment imager la vascularisation cutanée et la migration de cellules immunitaires au sein d'une tumeur établie. Vu la complexité de l'environnement tumoral, cela ne peut être effectué que chez l'animal.

Lors des TP, nous montrons aux stagiaires comment imager des souris selon les statifs utilisés et la question posée, ceci sur deux modèles : l'oreille (sans chirurgie) et la chambre dorsale (avec chirurgie)

Les souris utilisées pour ces formations seront les mâles issus de l'élevage d'un projet existant ne nécessitant que l'utilisation des femelles. Cela évitera ainsi d'utiliser d'autres animaux. Les conditions d'hébergement et les méthodes utilisées sont appropriées pour réduire toute angoisse. Les procédures seront réalisées sous anesthésie et un analgésique sera administré lors de la chirurgie. Le suivi des animaux sera journalier jusqu'au TP.

Ces deux formations ont lieu une fois par an et nécessitent l'utilisation de 12 souris au total/an pour les travaux pratiques soit 60 souris sur 5 ans.

11492 L'objectif de notre projet est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'émergence d'un lymphome B qui est un cancer des lymphocytes B (cellules du système immunitaire localisées dans la moelle osseuse, le sang et les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les ganglions lymphatiques). Ces tumeurs sont très hétérogènes rendant leur

traitement parfois impossible. Le développement d'un lymphome B est fonction des propriétés intrinsèques de la cellule tumorale (anomalies géniques) mais également des cellules normales environnantes qui participent à la croissance de la tumeur. Considérer l'organisme dans son ensemble est donc indispensable en cancérologie. En ce sens, nous développons des modèles de souris génétiquement modifiées pour étudier *in vivo* les processus de transformation des lymphocytes B pour à terme permettre d'envisager une meilleure thérapeutique de ces cancers. Au cours du processus de cancérisation, le lymphocyte B subit des modifications d'expression de ces gènes. A l'origine de cela, ce peut être, la dérégulation des facteurs de transcription NF-kappaB et c-Myc. Nous développons des modèles de souris présentant une dérégulation de NF-kappa B et /ou c-Myc pour suivre au cours du temps l'émergence de lymphomes B et étudier selon plusieurs approches expérimentales les mécanismes d'induction tumorale. La mutation activatrice de NF-kappa B, MYD88L265P est associée chez l'homme à plusieurs lymphomes B très différents. Pour comprendre cela, nous développons différents modèles de souris porteurs de cette mutation. Nous porterons également une attention particulière au rôle du micro-environnement immun normal sur la croissance tumorale. Enfin, les cellules tumorales subissent des modifications de leur ADN pour favoriser l'expression des gènes. Nous étudierons aussi l'impact de ces modifications de l'ADN sur l'émergence de lymphome B avec dérégulation de NF-kappa B et c-Myc.

Ce projet utilise au total 864 souris. Les effectifs de souris ont été choisis pour assurer la significativité statistique et pour limiter le nombre d'animaux utilisé soit 4 à 8 souris par type d'animaux génétiquement modifiés et par procédure expérimentale. Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir : remplacer : L'établissement de lignées cellulaires a largement permis d'améliorer nos connaissances de la biologie du cancer. Mais le cancer est une pathologie complexe avec des interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules normales environnantes (telles que les cellules du système immunitaire) qui participent à la prolifération et la survie des cellules tumorales, à l'angiogenèse et à la formation de métastases. Considérer l'organisme dans son ensemble est donc nécessaire en cancérologie. De ce fait, il est indispensable de valider ou d'invalider *in vivo* les mécanismes de transformation mis en évidence *in vitro* sur lignées cellulaires, ceci grâce à l'utilisation de modèles animaux. Ces modèles apportent ainsi la possibilité d'apprécier la dynamique du processus transformant au cours du développement de la cellule B et de tester *in vivo* de nouvelles molécules chimiothérapeutiques afin d'identifier celles avec un vrai potentiel thérapeutique chez l'homme. Réduire : Les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée pour ces études d'émergence tumorale *in vivo*. Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, points limites...).

11493 Ce projet concerne la production, chez la brebis, d'anticorps contre une protéine glomérulaire du rein de porc. Ces anticorps seront ensuite utilisés pour induire une néphropathie chez le porc via une injection systémique. Le modèle de porc "néphropathique" servira à tester des molécules thérapeutiques visant à réduire l'inflammation glomérulaire rénale. La réalisation de ce modèle est très importante pour développer et tester des médicaments utilisés pour traiter les pathologies rénales.

La production des anticorps sera induite par immunisation des brebis par des injections intradermiques de la protéine de rein purifiée. Le principe est le même que celui utilisé lors des vaccinations chez l'homme et l'animal, mais pour la production d'anticorps le système immunitaire est plus fortement stimulé par un nombre de rappels plus important.

Nous avons l'expérience de la production de ces anticorps chez la brebis pour avoir déjà produit des sérums dirigés contre des protéines glomérulaires de rein de souris et de macaques.

Le projet a été réfléchi pour respecter la règle des 3R :

Remplacer : nous ne pouvons produire ce sérum autrement que sur des brebis car nous devons en avoir de grandes quantités (plusieurs litres) que seule une espèce de grande taille peut fournir.

Réduire : Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire à la production de la quantité de sérum. Il faudra obtenir environ 3 à 5 litres de sérum spécifique de la protéine glomérulaire. 6 animaux seront donc utilisés dans ce projet.

Raffiner : les animaux seront hébergés en groupes sociaux stables, sur paille et avec du foin de qualité à volonté. Les manipulations des animaux se feront dans le calme. Pour réduire la douleur liée aux injections intradermiques, nous utiliserons une pommade anesthésique locale (pommade EMLA), appliquée 45 minutes à 1 heure avant les injections.

11494 L'objectif global de cette étude est de développer une stratégie thérapeutique pour une maladie neurodégénérative rare à l'aide d'un modèle souris, qui récapitule les caractéristiques de la maladie.

L'ataxie spinocérébelleuse de type 7 cause principalement une dégénérescence des neurones du cerveau et de la rétine de l'œil. En conséquence, les patients souffrent de difficultés à la marche et d'une perte d'acuité visuelle, qui se développent à l'âge adulte et progressent inexorablement vers une issue fatale pour les patients. A ce jour, aucun traitement ne permet de prévenir ou retarder la dégénérescence neuronale et l'apparition des symptômes.

La maladie est causée par une protéine mutée, qui s'accumule anormalement au sein des neurones et cause leur mort. Les stratégies thérapeutiques envisagées visent à prévenir l'accumulation de cette protéine dans les neurones du cerveau et de la rétine.

Pour arriver à cette fin, nous allons utiliser une macromolécule nommée shRNA qui a comme propriété d'empêcher la synthèse de la protéine mutée dans la cellule. Par soucis de REMPLACEMENT des modèles animaux, la preuve d'efficacité de ce shRNA a été d'abord obtenue dans les cellules de patients cultivées en laboratoire ; dans ces conditions, le shRNA a été capable de réduire de façon significative l'accumulation de la protéine mutée dans les cellules. Pour démontrer le véritable potentiel thérapeutique de ce shRNA, il est dorénavant nécessaire de tester leur efficacité dans un modèle souris, qui récapitule fidèlement les caractéristiques de la maladie.

L'objet de cette étude est donc de déterminer dans quelle mesure le shRNA peut prévenir l'accumulation de la protéine mutée et améliorer le phénotype de souris modèle. A l'issue de cette étude, nous espérons pouvoir déterminer si le shRNA est suffisamment efficace pour suivre un développement en vue d'une thérapie chez les patients. Cette étude se situe dans le domaine de la recherche translationnelle.

Nous utiliserons le modèle souris qui récapitule le plus mieux la maladie humaine, incluant l'accumulation de la protéine mutée dans les neurones ainsi que les atteintes visuelles et motrices (l'ataxie). L'utilisation de ce modèle est rependue dans le monde de la recherche, l'accès aux études publiées permet de REDUIRE le nombre des animaux et de RAFFINER les protocoles d'analyse. Par exemple, les atteintes visuelles et motrices débutent à l'âge juvénile de la souris (vers 10 semaines d'âge) et progressent lentement sans altérer des comportements de base des souris, comme la prise de nourriture, jusqu'à l'âge de 30 semaines ; au-delà de cet âge certaines souris commencent à perdre du poids indiquant que leur santé se détériore. Ces informations nous permettent donc de restreindre (et RAFFINER) le protocole d'analyse avant l'âge de 30 semaines où l'état des souris est normal, bien qu'elles montrent un phénotype visuel et moteur léger et quantifiable expérimentalement.

Au niveau expérimental, afin de REDUIRE le nombre des souris nécessaires à cette étude, nous procéderons par étapes successives. Premièrement, nous optimiserons les protocoles d'administration. Deuxièmement, nous testerons différentes doses de shRNA et différents protocoles d'administration de façon cibler à la fois dans le cerveau et la rétine de l'œil chez le même animal. Troisièmement, nous utiliserons les conditions les plus efficaces pour traiter les souris modèles au stade pré-symptomatique. Enfin, si le traitement pré-symptomatique s'avère efficace, nous effectuerons un traitement post-symptomatique, qui est plus adapté à la réalité d'un traitement chez les patients.

Les traitements se feront par injection systémique de shRNA via un vecteur viral fréquemment utilisé en thérapie génique chez la souris. Les injections auront lieu sous une anesthésie générale effectuée selon des protocoles préétablis par nos collaborateurs experts dans le domaine (RAFFINEMENT). Les personnes qui opèreront ces anesthésies possèdent déjà une habilitation à l'expérimentation animale et une expérience en anesthésie.

L'efficacité des traitements sera évaluée par des tests visuels et moteurs, selon des protocoles préétablis dans notre laboratoire, et par des études moléculaires et histologiques sur tissus des souris traitées, prélevés après leur euthanasie.

Nous anticipons que les traitements mèneront soit un effet bénéfique pour prévenir l'accumulation de la protéine mutée ou aucun effet. Des effets délétères du shRNA sont peu probables, comme le suggèrent plusieurs publications où le même type de macromolécules a été utilisé. Il est important de noter que ce type de stratégie thérapeutique est actuellement en phase clinique chez des patients atteints d'autres maladies.

Au cas où notre shRNA causeraient des effets délétères (par exemples : perte du poids, inactivité, souffrance), les souris seront isolées temporairement afin de discuter avec le/la vétérinaire des actions à entreprendre : soins analgésiques, facilité l'accès à la nourriture ou euthanasie. De façon générale, les souris seront suivies trois fois par semaine tout au long de la procédure expérimentale, afin d'identifier si les souris traitées ont un comportement anormal.

Globalement, notre étude pourrait utiliser un maximum de 295 souris.

11495 L'espèce bactérienne *Klebsiella pneumoniae* est placée au premier plan des pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales. *K. pneumoniae* est un organisme modèle particulièrement pertinent puisque cette bactérie est naturellement retrouvée dans le tube digestif et les cavités naturelles de l'homme, mais également associée à du matériel médical ou lors d'infections comme des bactériémies et des pneumonies. Les interactions compétitives de ce pathogène au sein de communautés microbiennes complexes sont méconnues. Il a récemment été décrit l'implication de complexes multi-protéiques appelés systèmes de sécrétion de type 6 (SST6) dans les phénomènes de compétition inter-bactérienne. Ces systèmes agissent comme des arbalètes en injectant des protéines toxiques (effecteurs) dans le cytoplasme de bactéries adjacentes, conférant ainsi un avantage sélectif au sein de communautés complexes. L'analyse des séquences de génomes de *K. pneumoniae* nous a permis de mettre en évidence l'existence des SST6, mais leur rôle n'a pas été élucidé.

Le projet proposé a pour but d'élargir nos connaissances fondamentales en explorant les propriétés d'un pathogène majeur en clinique humaine et impliqué dans la transmission des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement. Il sera principalement structuré autour de deux grandes parties complémentaires permettant i) la caractérisation des SST6 de *K. pneumoniae* d'un point de vue moléculaire par des approches de biochimie et biologie moléculaire (*in vitro*) et ii) la détermination de leurs rôles dans les compétitions inter-bactériennes au sein de communautés bactériennes naturelles et complexes (microbiotes intestinaux et pulmonaires de modèle murin).

Le recours à l'animal est indispensable pour la partie ii de ce projet : en effet, il n'existe pas de méthode alternative permettant d'évaluer simultanément les capacités de colonisation des tissus, de virulence et de persistance dans un même organisme hôte. De plus, la présence d'un microbiote complexe ne peut en aucun cas être mimée par les techniques de microbiologie actuelle. Les procédures (Instillation nasale de *K. pneumoniae* : modèle de pneumonie et Gavage de *K. pneumoniae* : modèle de portage intestinal) seront optimisées afin de réduire l'inconfort, la douleur ou l'anxiété subies par les animaux. Des antalgiques seront administrés aux animaux si nécessaire. Les expérimentations seront organisées de façon à obtenir des résultats statistiquement exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possible, et chaque expérience sera exploitée au maximum. Le nombre maximal estimé d'animaux est de 330 souris sur une période de 5 ans.

11496 Notre sujet de recherche est orienté vers l'étude des mécanismes moléculaires contrôlant le développement du cortex cérébral et, lorsqu'ils sont perturbés, sont à l'origine de maladies neuro-développementales chez l'homme. En particulier, l'objectif principal de notre travail est de mieux comprendre le rôle du centrosome au cours de ce processus complexe de développement. Le centrosome est une organelle clé de la cellule car il participe grandement à l'établissement et au maintien de la morphologie cellulaire et à l'organisation intracellulaire des autres composants de la cellule. Des mutations dans des gènes codant pour des protéines centrosomales sont associées à des pathologies du système nerveux tel que l'épilepsie ou la microcéphalie. Ici nous souhaitons comprendre comment cette organelle régule le développement du cortex et pourquoi le cerveau est si sensible à des défauts de composition du centrosome. Ainsi nous pourrions améliorer notre compréhension des mécanismes soutenant l'apparition dans ces maladies chez l'homme.

Le développement du cortex a été bien décrit chez les mammifères et est très proche du développement humain. Dès lors, ce modèle est le plus adapté pour répondre à notre question biologique. De plus, aucun modèle d'expérimentation *in vitro* ne peut mimer ou refléter toute la complexité des phénomènes ayant lieu dans le cortex en développement, tels que la prolifération des progéniteurs neuronaux, la migration et la différenciation neuronales.

Nous analysons le rôle de nos gènes d'intérêt pendant les stades de développement embryonnaire du cerveau grâce à des approches génétiques visant à modifier l'expression ou la fonction des protéines étudiées. Pour cela, nous avons besoin de transférer de l'ADN plasmidique non pathogène par un protocole d'injection/électroporation *in utero* dans le système nerveux central d'embryons de souris gestante anesthésiées. En euthanasiant les animaux à différents temps de la gestation, nous pouvons étudier les conséquences cellulaires de ces modifications génétiques sur les différentes phases du développement du cerveau.

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet est estimé à 5904 (femelles gestantes, embryons ou pups), ce qui correspond à 804 femelles opérées. Le nombre de souris utilisées est justifié par l'étude des conséquences de la perte de fonction et de la surexpression des formes mutées des gènes d'intérêts (6 conditions au total- 4 gènes d'intérêt) à différents stades du développement (2 stades embryonnaires et 2 stades postnataux).

L'utilisation de l'expérimentation animale pour nos travaux est rendue nécessaire par la complexité de l'environnement cortical qui ne peut pas être recréé par des approches *in vitro*. Toutefois, nous garderons à l'esprit notre responsabilité de diminuer au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en atteignant la significativité statistique. Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés, aucune nouvelle expérience ne sera effectuée avant qu'une analyse complète des précédentes ne soit réalisée.

Nous prendrons en compte avec la plus grande attention le bien-être de nos animaux. L'élevage et la reproduction de nos animaux se font dans un environnement contrôlé permettant une réduction du stress pour l'animal. Durant l'expérimentation les femelles gestantes sont anesthésiées par voie gazeuse (isoflurane). Nous limitons le temps de manipulation à 45 minutes sur l'animal anesthésié. Un anti-inflammatoire non-stéroïdien, la metacam, est injecté avant l'opération par voie sous-cutanée. La metacam est également ajoutée au biberon pendant 2 jours après la chirurgie. L'animal se réveille dans une cage chauffée à 35°C et est surveillé régulièrement. Nous vérifions que les animaux mangent et s'abreuvent normalement. Les jours suivants, les animaux sont surveillés deux fois par jour pour voir notamment si la plaie a besoin de soins et pour détecter d'éventuelles infections post-chirurgicales ou autres complications. L'objectif est de prévenir toute douleur ou détresse. En cas d'infections importantes ou de douleur manifeste, les animaux sont euthanasiés immédiatement.

11497 L'invention porte sur la création de deux modèles murins génétiquement modifiés permettant la production d'anticorps thérapeutiques neutralisant une cible d'intérêt dans diverses pathologies. L'immunisation des animaux avec ces molécules cibles permettra la production d'anticorps de haute affinité dans le but de mettre au point une méthode d'immunothérapie. Ces lignées vont être générées par transfection de cellules souches embryonnaires murines puis micro-injections des cellules modifiées dans des blastocystes de souris puis réimplantations dans des femelles pseudo-

gestantes, selon la méthode de référence de transgénèse. Une fois les animaux générés, le niveau d'expression du gène codant l'anticorps sera évalué sur prélèvements sanguins par biologie moléculaire et dosages biochimiques. Après vérification de ces premières analyses, différents organes seront prélevés dans le but d'analyser le développement lymphocytaire et d'isoler les cellules produisant l'anticorps spécifique. L'utilisation de modèles murins est nécessaire afin de reproduire une réponse immunitaire *in vivo* dirigée contre une cible spécifique. Ceci permettra de produire des anticorps thérapeutiques de haute affinité pour les cibles d'intérêt et ainsi de mettre au point un traitement d'immunothérapie spécifique.

Ce projet utilise au total 231 souris.

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

Remplacer : La réponse immunitaire observée *in vivo* suite à l'immunisation avec des molécules cibles n'est pas transposable *in vitro*. En effet, les cellules isolées en culture ne peuvent que très partiellement refléter la réponse d'un tissu ou d'un organe complet. L'immunisation des souris avec une molécule d'intérêt va permettre la production d'anticorps thérapeutiques de haute affinité neutralisant des molécules inflammatoires impliquées dans diverses pathologies.

Réduire : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, le protocole d'immunisation sera préalablement mis au point sur un nombre limité de souris sauvages. Les expériences seront réalisées dans un ordre précis et avec des témoins choisis de manière à réduire le nombre d'expériences.

Raffiner : Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, analgésique post opératoire).

11498 Pendant des millions d'années, la gravité a façonné tous les organismes aussi bien animaux que végétaux. L'absence de gravité lors des vols spatiaux perturbe les systèmes musculaires, nerveux ou cardiovasculaires. Au niveau musculaire, une atrophie majeure et des modifications de propriétés contractiles sont observées dès les premiers jours d'un vol spatial. Les vols spatiaux habités étant rares, les scientifiques se sont tournés vers l'expérimentation animale (rats ou souris). C'est ainsi qu'a été lancé en 2013 un satellite russe automatique (BION) avec différents animaux (dont des souris) pour étudier ces phénomènes.

Afin de préparer un nouveau vol spatial BION prévu en 2022, d'une durée de 30 jours, nous prévoyons des expériences de faisabilité. De fait, nous nous sommes orientés vers un modèle animal de simulation de la microgravité (hypodynamie-hypokinésie ou HH), pertinent pour cette étude. Les animaux embarqués seront équipés d'un capteur télémétrique permettant d'enregistrer l'électromyogramme, caractéristique de l'activité électrique musculaire. La méthode télémétrique permet d'enregistrer en continu à la fois l'électromyogramme et la température chez un animal vigile, non contraint et dans son environnement habituel. Après l'implantation des capteurs et le suivi post-opératoire, les animaux ne sont plus soumis à aucune manœuvre susceptible d'induire de la souffrance ou de la douleur. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum sans compromettre la significativité des résultats. Une attention particulière sera portée au bien-être des animaux et des mesures de raffinement seront mises en place pour limiter le stress et la douleur. Ainsi les gestes chirurgicaux seront effectués sous anesthésie générale, avec des points de suture internalisés suivis d'une réhydratation par solution glucosée. Les ongles des souris seront raccourcis pour limiter les grattages et les griffures entre animaux. Un traitement analgésique adapté sur plusieurs jours permettra de réduire au maximum la douleur post-opératoire. Les souris seront remises en groupe dès que possible avec une alimentation à disposition dans la cage et du coton pour favoriser la nidification. Pendant la période d'hypodynamie-hypokinésie, les animaux sont disposés en batterie, disposent des enrichissements habituels et gardent des contacts physiques et visuels. Une observation quotidienne des animaux permettra d'identifier tout signe de souffrance et la mise en

place de points limites précis anticipera toute douleur inutile à l'animal. Le nombre total de souris sera de 80 pour cette étude.

REDUCTION : l'ensemble des procédures expérimentales nécessaires à l'accomplissement de ces études requiert un nombre total de 80 souris. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisants (différences statistiquement observables entre les animaux traités et les animaux contrôles).

RAFFINEMENT : dans tous les cas, l'ensemble des procédures expérimentales seront réalisées en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux, et en étant particulièrement vigilant sur les points limites.

REMPLACEMENT : il s'agit d'un projet portant sur l'inactivité physique et ses effets sur les propriétés électriques musculaires. Un tel projet ne peut être mené avec des méthodes alternatives *in vitro* ou *in silico*.

11499 L'objectif de ce projet de recherche est d'explorer les relations mutuelles existant entre le stress social et la consommation d'aliments de réconfort chez deux espèces modèles, le mangabey à collier (*Cercocebus torquatus*) et le cheval domestique (*Equus caballus*). Vingt animaux adultes mâles et femelles de chaque espèce modèle seront soumis à deux séries de tests comportementaux. Ces sujets proviendront de groupes sociaux de composition et de taille variables. Lors d'une première série de tests, les animaux seront isolés de leur groupe social pendant 10 min avant de se voir proposer deux types d'aliments lors d'un test de choix alimentaire : un aliment palatable sucré et/ou gras vs un aliment standard et équilibré. Lors d'une seconde série de tests, les animaux seront isolés de leur groupe social et recevront immédiatement un aliment : soit un aliment palatable sucré et/ou gras, soit un aliment standard équilibré. Six à dix répétitions de chaque test seront réalisées par animal, la seconde série ne débutant qu'après la fin de la première série. Chaque animal sera testé une seule fois par jour, le matin avant la distribution quotidienne et habituelle d'aliment. Différents paramètres comportementaux seront enregistrés et analysés durant les périodes d'isolement et d'alimentation. Ce projet permettra d'une part de comprendre la manière dont certains types d'aliments, dits de réconfort, peuvent soulager un état de stress social, et d'autre part de déterminer dans quelle mesure l'expérience d'un stress social peut favoriser la consommation d'aliments palatables mais nutritionnellement déséquilibrés.

REMPLACEMENT : l'objectif étant d'étudier les comportements liés à l'alimentation et au stress social, il est obligatoire de travailler sur des animaux vivants. L'utilisation de deux espèces très différentes (primates non humains omnivores et équidés herbivores) permettra d'explorer l'existence de similarités/différences dans les relations entre stress et alimentation chez deux modèles aux régimes alimentaires contrastés et d'envisager leurs conséquences dans deux environnements d'élevage aux finalités bien différentes.

REDUCTION : du fait de la variabilité des mesures enregistrées, vingt animaux par espèce est un minimum requis pour détecter d'éventuelles différences de profils individuels.

RAFFINEMENT : les méthodes d'isolement des animaux suivent des procédures classiquement en usage dans les élevages de primates et d'équidés, pour les soins vétérinaires par exemple. Les tests de comportement envisagés sont également bien décrits et reconnus dans la littérature. Une liste non exhaustive de points limites a été dressée, permettant aux pilotes du projet et aux expérimentateurs de terrain d'exclure des animaux du protocole.

11500 En France, les activités agricoles sont responsables de 97% des émissions d'ammoniac (NH₃) dont la moitié est imputable aux cheptels bovins. Les émissions de gaz azotés (NH₃ mais aussi N₂O, puissant gaz à effet de serre) sont en majorité liées à l'excrétion d'azote pas les animaux, en particulier sous forme uréique. La caractérisation des flux d'azote et d'urée excrétés, qui peuvent varier considérablement en quantité et en proportion selon le régime et les caractéristiques de l'animal, est ainsi une étape indispensable à l'évaluation de pratiques de réduction des impacts environnementaux. Or, dans la bibliographie, les études qui s'attachent à quantifier ces flux mettent en évidence de forts défauts de bilan (entrées N – sorties N > 0), suggérant qu'une partie de l'azote ingéré (jusqu'à 10%) n'est pas récupéré. Plusieurs questions se posent alors : où part cet azote, est-il susceptible de volatiliser, peut-on maîtriser ces flux ? Il existerait une relation positive entre

défaut de bilan N et évapotranspiration chez la vache laitière. L'urée étant une molécule qui diffuse dans tous les fluides corporels, il est probable qu'il y en ait également dans la sueur. Aucune donnée n'est disponible dans la littérature concernant la composition de la sueur chez les bovins, notamment car il n'existe aucune méthode de collecte simple à ce jour. Or, chez l'homme, la sueur concentre entre 3 et 5 fois l'urée par rapport à sa teneur dans le sang. Si tel est cas chez la vache, la sueur pourrait donc représenter un flux non négligeable d'azote non comptabilisé jusque-là dans les bilans. A la surface de la peau, cet azote, en partie sous forme uréique, pourrait par ailleurs volatiliser sous forme ammoniacale et participer aux impacts sur l'environnement. Dans le cadre d'un projet précédent, quelques échantillons de sueur ont pu être collectés sur vaches laitières. Il a été possible d'y détecter de l'urée, en concentration très variable (inter et intra-vache). L'objectif opérationnel de ce projet est de mettre au point une méthode de collecte et de dosage des composés azotés de la sueur sur bovin, sur la base de nos premiers essais, et de mettre en œuvre ce protocole lors d'une expérimentation. Celle-ci permettra de comparer les pertes d'urée par la sueur selon deux niveaux de températures ambiantes : une température constante proche de la thermoneutralité (pas de stress thermique, environ 18°C) et une situation avec des pics de chaleur diurnes (autour de 25 à 28°C) entrecoupés de phases de récupération nocturnes (autour de 20°C). Durant cet essai, des bilans entrées-sorties seront réalisés pour le suivi des flux d'azote et d'urée à l'échelle de l'animal, incluant l'utilisation du dispositif de collecte de la sueur. La mesure de la teneur en composés azotés associée à l'estimation de l'évapotranspiration permettra de quantifier les pertes d'azote via la sueur par la vache. La mise au point méthodologique est une étape essentielle ; elle devra permettre d'aboutir à un dispositif adapté et à une méthodologie répétable et reproductible. La composition de la sueur (et éventuellement sa variabilité en fonction des sites de collecte sur l'animal) sera analysée finement (composés uréiques et non uréiques). L'objectif finalisé à plus long terme serait de proposer une méthode de calcul de l'excrétion d'azote via la sueur qui serait ainsi prise en compte dans les bilans d'azote à l'échelle de l'animal.

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour étudier les flux d'azote et d'urée à l'échelle de l'animal, incluant des mécanismes de recyclage/mobilisation notamment au sein du rumen et par la salive. Réduire : Le schéma expérimental en carré latin avec 2 répétitions des traitements ainsi que l'analyse statistique des données permettront de répondre aux objectifs scientifiques tout en limitant le nombre d'animaux à 6 dans ce projet. Raffiner : La conduite d'élevage sera respectueuse du bien-être des animaux. Un suivi régulier du comportement des animaux sera mis en place pour détecter le plus rapidement possible tout signe de souffrance ou de douleur. Des points limites adaptés ont été définis afin d'éviter au maximum toute forme de souffrance des animaux.

11501 L'atrophie multisystématisée (AMS) est une maladie neurodégénérative sporadique rare et dont la cause est inconnue touchant plus de 3000 personnes en France. L'AMS se traduit par un syndrome parkinsonien, des troubles de la coordination des mouvements, d'origine neurologique, conduisant à une grave invalidité motrice, ainsi que par un dysfonctionnement du système nerveux végétatif qui se traduit par des troubles respiratoires, cardiaques et urogénitaux. L'espérance de vie moyenne après la déclaration de l'AMS est inférieure à 9 ans et il n'existe à l'heure actuelle, aucun traitement disponible pour atténuer la sévérité des symptômes ou la progression de cette maladie dévastatrice. Au niveau cellulaire, l'AMS se caractérise par la présence d'inclusions cytoplasmiques contenant la une protéine toxique, caractéristiques des maladies neurodégénératives appelée l'alpha-synucléine (SYN) dans certains types de neurones. Selon plusieurs données expérimentales, l'agrégation de la SYN serait à l'origine des déficits moteurs et du processus neurodégénératif de l'AMS.

Du fait de la gravité, de la rapidité et de la généralisation du processus neurodégénératif, le développement de traitements neuroprotecteurs capables de ralentir l'évolution de la maladie constitue un besoin urgent. L'accumulation de la SYN résulte d'un processus d'assemblage de molécules anormalement repliées de SYN qui vont former des oligomères. Ces oligomères vont jouer un rôle majeur dans le processus neurodégénératif. Nos précédents travaux ont également identifié que la troncation de l'alpha-synucléine est un des mécanismes qui favorise son agrégation.

Le but de ce projet est d'évaluer le potentiel thérapeutique de deux molécules administrées conjointement, l'une sera capable d'empêcher le processus d'oligomérisation, et l'autre d'empêcher la troncation de l'alpha-synucléine. Ces molécules seront testées sur une lignée murine, appelée PLP-Syn qui surexprime l' α -syn. Si cette lignée n'a pas de phénotype nocif pouvant altérer sa qualité de vie, elle montre néanmoins un léger déficit moteur, détectable au court de tests comportementaux qui analysent une motricité fine. Notre déroulé expérimental sera une administration des molécules dans la nourriture pour la première molécule et l'autre par gavage pour durant 4 mois, suivi d'un test comportemental faisant appel au comportement moteur spontané de l'animal sans contention pour mesurer l'effet de ces molécules sur la motricité des animaux. Le cerveau sera ensuite prélevé pour des analyses histologiques.

Dans le respect du R de remplacer, dans les connaissances actuelles, aucun modèle *in vitro* ne peut nous donner les informations recherchées, en l'occurrence l'amélioration de trouble moteur chez dans un modèle de l'AMS. Dans le respect de la règle des 3R afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse de puissance a été effectuée, permettant de réduire le nombre à 60 souris incluant les groupes expérimentaux et leur contrôle. Pour le respect du R de raffiner, les procédures prévues sont légères, nous avons vérifié par ailleurs qu'aucune donnée actuelle n'indique que les molécules testées soient susceptibles d'entraîner une souffrance chez les animaux. Les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures, soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent les animaux à en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

11502 Toutes les cellules d'un organisme partagent le même patrimoine génétique (l'ADN) mais l'expriment de façon différente selon le tissu auxquelles elles appartiennent. Cette régulation de l'expression des gènes qui est donc spécifique pour chaque organe, est assurée par un ensemble de mécanismes biologiques regroupés sous le terme « épigénétique ». Les tumeurs du cerveau sont au second rang des cancers pédiatriques par leur fréquence après les leucémies. Les enfants touchés développent ces tumeurs entre 7 et 13 ans. L'absence de traitement efficace se traduit par une espérance de vie inférieure à 2 ans. L'objectif du projet est de comprendre l'effet de la mutation d'un gène sur le paysage épigénétique dans le cerveau. Cela nous permettra de comprendre comment cette mutation entraîne une dérégulation épigénétique et le développement d'une tumeur.

Nos résultats préliminaires, obtenus à partir de cellules en culture (*in vitro*), représentent une piste très prometteuse dans la compréhension de ce cancer ainsi que pour le développement de traitements efficaces. Les mécanismes épigénétiques étant spécifiques de chaque organe, il est impératif de valider l'ensemble de nos conclusions au sein d'un organisme entier (Remplacement). Nous utilisons la souris comme modèle car les souris transgéniques relatives à nos cibles existent déjà et que la cible épigénétique concernée possède 100% d'homologie avec l'humain. Les souris seront surveillées attentivement afin de détecter toute apparition de souffrances (Raffinement). De plus, le champ d'étude a été choisi en amont au développement attendu de tumeurs et des points limites sont définis pour éviter toute souffrance potentielle.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum tout en garantissant des résultats statistiquement analysables à chaque stade (Réduction).

Au total, ce projet représente 3018 animaux, dont 2560 servant au maintien des lignées pendant la durée du projet et 458 utilisés directement pour l'étude.

11503 Le projet vise à mieux comprendre les bases physiopathologiques de CMT4H, une forme démyélinisante autosomique récessive de la maladie de Charcot-Marie-Tooth, maladie

neuromusculaire qui touche le Système Nerveux Périphérique (SNP) et plus particulièrement, la myéline du SNP.

En vue de développer de nouveaux traitements pour cette maladie, aujourd'hui incurable, nous souhaitons développer un modèle poisson de cette pathologie. En effet, le poisson zèbre, comme tout animal vertébré à mâchoires, a de la myéline, et surtout la constitution de la myéline et les processus de myélinisation sont bien conservés entre le poisson zèbre et les mammifères. Un des atouts de ce modèle réside dans le fait que les animaux juvéniles (jusqu'à 45 jours après ponte) sont transparents, ce qui induit que l'on peut facilement suivre, *in vivo*, la dynamique du développement de la myéline. Un autre aspect intéressant de ce modèle est que l'on peut facilement tester un grand nombre de molécules thérapeutiques, puisque le traitement est réalisé par ajout de la molécule d'intérêt dans l'eau (procédure non douloureuse).

Dans le cadre de nos recherches, nous utiliserons 2050 poissons sur 5 ans, en appliquant la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner), pour limiter au maximum le nombre d'animaux que nous utilisons et diminuer ou supprimer la douleur. Il n'existe pas de méthode alternative pour notre projet.

Ainsi, afin de réduire au maximum, le stress et l'angoisse, les conditions d'élevage sont parfaitement maîtrisées. Les poissons sont élevés dans des aquariums au sein d'un système ZebTEC rack de TECNIPLAST, qui permet de contrôler, en temps réel, différents paramètres de qualité d'eau, comme la température, la résistivité, le pH et surtout, le taux de nitrites et de nitrates. De plus, l'accès au système est réglementé et autorisé aux seules personnes habilitées et formées, ce qui permet de réduire au maximum le stress des animaux. Ils sont élevés en groupe de 10 poissons pour 3l d'eau et nous procédons à un enrichissement du milieu en utilisant de la nourriture vivante (paramécies jusqu'à 30 jours après ponte et crevettes artémias à partir de 21 jours après ponte) afin de leur permettre de chasser comme dans le milieu naturel. Tout animal qui présente des signes de maladie, angoisse, stress ou détresse, est isolé et euthanasié selon la procédure décrite dans le projet.

11504 Objectifs du projet :

Les lésions cérébrales et cardiaques représentent la cause majeure de décès dans le monde. Ces pathologies peuvent être d'origine ischémique, c'est-à-dire qu'elles peuvent être provoquées par l'arrêt du flux sanguin, entraînant la privation en oxygène et nutriments du tissu cérébral ou cardiaque. On parle alors d'accident vasculaire ischémique (AVCI) et d'infarctus du myocarde (IDM). Ces deux maladies se caractérisent par des facteurs de risque communs : hypertension artérielle, hypercholestérolémie, diabète, obésité et antécédents familiaux de ces pathologies. En clinique, la plupart des décès après un AVCI résultent de cause neurologique, mais ils sont suivis en deuxième position par des décès d'origine cardiaque. En effet, 2 à 6% des patients ayant fait un AVCI font un IDM dans les trois mois suivant l'accident initial. On pense aujourd'hui que les lésions cérébrales provoquées par l'AVCI augmentent le risque de développer des lésions cardiaques ultérieures et sensibilisent le cœur à l'ischémie. Toutefois, peu de travaux ont à ce jour exploré ces aspects et tenté d'en élucider les mécanismes.

L'objectif de notre projet est de mieux comprendre les interactions cœur-cerveau dans les processus ischémiques, au moyen d'une étude expérimentale conduite chez le rat. Afin de reproduire les conditions de l'AVCI, nous envisageons de réaliser tout d'abord un infarctus cérébral chez le rat adulte par l'injection de microsphères dans la circulation artérielle cérébrale, et dans un deuxième temps, par l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (OACM) par la technique du filament. Par la suite, nous souhaitons mesurer les fonctions vasculaires et cardiaques de manière périodique grâce à des mesures de pression artérielle et d'échocardiographie. Enfin, nous testerons sous anesthésie la sensibilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion (un arrêt du flux sanguin suivi du retour de ce flux au niveau du cœur). Nous réaliserons des prélèvements après l'euthanasie, afin de mesurer la taille des infarctus et l'expression de gènes et protéines. Enfin, nous souhaitons envisager des possibilités de traitements médicamenteux, susceptibles de limiter les atteintes cardiaques induites par l'infarctus cérébral.

Avantages du projet :

Ces modèles sont des modèles uniques car ils permettent d'observer comment un infarctus cérébral peut influencer la sensibilité du cœur à l'ischémie. Ils se rapprochent de situations rencontrées chez l'Homme (infarctus du myocarde après un AVC) et qui représentent une problématique clinique majeure, pour laquelle on ne dispose aujourd'hui que de peu d'informations.

Nombre et type d'animaux :

Notre étude sera conduite chez un maximum de 476 rats males Wistar adultes (4 à 6 mois) sur une durée de 5 ans.

Une étude préalable de mise au point du modèle d'OACM par la technique du filament devra déterminer les conditions de l'ischémie cérébrale : durée de l'ischémie cérébrale, localisation de l'infarctus au niveau de l'hémisphère cérébral droit ou gauche, temps d'attente entre l'infarctus cérébral et l'évaluation de la fonction cardiaque. Nous envisageons que cette étude préalable nous amène à utiliser 80 rats.

Une comparaison des techniques (embolisation par microsphères versus OACM) comportera 3 groupes de 12 rats embolisés par microsphères, soit 36 rats

L'étude sur les conséquences cardiaques de l'AVC (permanent ou transitoire), sera conduite sur des groupes, Témoins, AVC droit et AVC gauche, constitués 12 rats chacun. Il sera nécessaire de constituer 30 groupes différents répartis en 3 séries expérimentales (pour les investigations à différents temps (2H, 24H et 7J), pour les mesures *in vivo* et *ex vivo* et pour le recueil de cœurs non soumis à une perfusion *ex vivo*), ce qui représente 360 rats.

Remplacement, réduction, raffinement :

Ce projet de recherche, qui repose sur des interactions entre différents organes (cœur et cerveau) ne peut malheureusement être approché par des techniques reposant sur la culture cellulaire. Il nécessite d'être conduit sur un animal entier et ne peut être remplacé par des techniques de culture cellulaire. Lors de l'étude préalable, un nombre MAXIMUM de 80 rats sera utilisé, mais ce nombre pourra être réduit à 40-60 si les premiers essais s'avèrent concluants. Par la suite, ne seront utilisés que le nombre d'animaux strictement nécessaires, soit un total de 12 rats par groupe, suffisant à la conduite du projet et à l'obtention de données statistiques.

Afin d'améliorer la qualité de vie des rongeurs, l'environnement sera enrichi par des objets placés dans les cages. L'ensemble du travail devra se faire avec calme et douceur afin de ne pas stresser les animaux. Les manipulations non douloureuses (pesées, mesure de la pression artérielle) se feront dans des conditions de calme non stressantes. Toutes les procédures chirurgicales seront accompagnées de l'utilisation d'antalgiques appropriés (lidocaïne locale, buprénorphine injectable) afin d'inhiber la douleur occasionnée. Le suivi post opératoire sera strictement encadré (réveil et maintien en couveuse, surveillance) afin de détecter des signes précoces de souffrance (aspect physique externe, non réponses comportementales aux stimuli externes, diminution de la fréquence cardiaque et respiratoire, état de prostration.), qui seront éventuellement traités par une nouvelle administration d'antalgiques. Tout animal moribond ou dont l'état fonctionnel sera dégradé sera euthanasié (inhalation de CO₂).

11505 L'objectif de cette étude est de mieux comprendre le rôle physiologique des co-transporteurs lactate proton de type MCT1 dans le muscle squelettique.

Le lactate est un substrat énergétique important lors de l'activité musculaire, et des accumulations importantes en protons (un phénomène qui provoque une diminution du pH, et donc une acidose, dans la cellule) et en lactate sont considérées comme néfastes pour l'activité musculaire. De ce fait, MCT1 occupe une place centrale dans le fonctionnement du muscle étant donné qu'il intervient dans le transfert du lactate et des protons depuis l'intérieur de la cellule musculaire vers le sang. Toutefois, bien que MCT1 ait été parfaitement caractérisé d'un point de vue biochimique et enzymologique, son rôle physiologique dans le muscle en activité demeure très peu étudié et les quelques résultats expérimentaux qui ont été obtenus sont contradictoires.

L'étude de l'implication de MCT1 dans la production d'énergie et dans la régulation du pH au cours de l'effort devrait fournir des éléments précieux pour une meilleure compréhension de la fonction

musculaire dans des conditions normales et physiopathologiques (drépanocytose, hémoglobinopathie, myopathie).

Design de l'étude

Nous allons utiliser un modèle de souris génétiquement modifiés appelés MCT1+/- . Ce modèle, qui est parfaitement viable et présente un faible contenu de MCT1 dans les cellules musculaires comparé à des souris contrôles, nous donne l'opportunité d'explorer directement le rôle de MCT1 *in vivo* dans le métabolisme énergétique au repos et à l'exercice. L'exploration du métabolisme énergétique sera réalisée au moyen de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du phosphore 31 (SRM du P31). Cette technique offre la possibilité de mesurer *in vivo* le pH intracellulaire et les concentrations des principaux composés phosphorylés (ATP, phosphocréatine, ADP, phosphate inorganique) impliqués dans le métabolisme énergétique, ceci de façon simultanée, non invasive et en continue lors de protocoles expérimentaux consistant en la succession de périodes de repos, d'exercice musculaire et de récupération.

Nos travaux se dérouleront donc dans le strict respect de la règle des 3R (remplacer, réduire et raffiner). En effet, l'utilisation de la SRM du P31 permettra de par son caractère non invasif et totalement indolore de réduire la douleur et le stress des animaux. La SRM du P31 réduira également le nombre d'animaux utilisés car elle permet d'enregistrer des cinétiques métaboliques chez les mêmes individus, contrairement aux techniques classiques de biochimie qui auraient nécessité d'euthanasier des cohortes d'animaux aux différents temps de la cinétique afin de réaliser des dosages métaboliques sur biopsies musculaires. De plus, nous n'utiliserons que le nombre de souris nécessaires pour l'exploitation statistiques des données, à savoir 40 individus en tout (un groupe de 20 souris MCT1+/- sera comparé à un groupe de 20 souris contrôles).

Par ailleurs, il est important de préciser que les critères métaboliques et fonctionnels que nous allons étudier sont de types physiologiques, et ne sont donc pas reproductibles avec des cultures de cellules musculaires ; c'est pourquoi nous ne pouvons pas remplacer l'étude chez l'animal vivant.

Gestion du bien-être animal

Toujours dans le respect de la règle des 3R, les expériences seront réalisées dans une pièce à l'écart de la salle d'hébergement par des manipulateurs formés au bien-être animal. De plus, nous avons déterminé des points limites à ne pas franchir pour respecter le bien-être de l'animal : un contrôle quotidien de l'état clinique de nos animaux sera réalisé selon un système d'évaluation avec indices de 0 (normal ou léger) à 3 (changements importants par rapport à la normale) pour différents critères physiologiques et comportementaux (perte de poids, vocalisation importante, poils hérissés, prostration, blessures, infections cutanées). Le protocole sera arrêté pour tout animal obtenant un score supérieur ou égal à 2 dans deux de ces catégories. Les souris seront hébergées collectivement (4 à 5 animaux par cage) et le milieu sera enrichi par la présence dans chaque cage de matériel de nidation (coton), d'abris en plastique permettant aux animaux de se cacher, et de bûchettes de bois destinées à être rongées. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies *ad libitum*. Le changement des litières aura lieu une fois par semaine.

11506 Le développement d'aliments fonctionnels innovants à destination de différentes populations (séniors, personnes en surpoids,..) permettant de modifier les sensations de satiété et la cinétique de libération de nutriments dans le sang nécessite de comprendre les liens entre structure des aliments et cinétique de vidange gastrique, de libération d'hormones régulant la prise alimentaire et d'absorption de nutriments. L'objectif de ce projet de recherche est de comparer chez le porc 1-la vitesse de vidange gastrique d'une protéine du lait, la caséine, présentée sous deux formes : caseinate de sodium ou caséine micellaire, 2-les cinétiques de libération dans le sang des acides aminés de ces deux formes de protéines et 3- les cinétiques de sécrétion d'hormones intestinales impliquées dans la régulation de l'appétit et de la satiété suite à l'ingestion de ces deux formes de caséine.

Seize porcs Largewhite x Landrace x Pietrain seront utilisés. Après implantation chirurgicale d'un cathéter dans la veine jugulaire, dis des seize animaux seront habitués à rester calmes et immobiles dans un statif de Pavlov pendant 2h. Ils seront également habitués à consommer les deux formes

de caséine, présentée sous forme de bouillie. Après ces phases d'habituatation, la vidange gastrique des deux formes de caséine sera étudiée par scintigraphie digestive sur animaux vigiles après ingestion des caséines marquées par un radio-élément. Les animaux subiront deux mesures de vidange, une par type de caséine, espacées de 7 jours. En parallèle de la mesure de vidange gastrique, des prélèvements de sang sériés (7 au total, étalés sur 2h) seront réalisés via le cathéter jugulaire pour mesurer les variations plasmatiques de diverses hormones gastro-intestinales, de la glycémie et des concentrations en acides aminés libres. Les 6 autres porcs seront habitués à consommer les deux formes de caséine, présentée sous forme de bouillie. Ils subiront des prélèvements sanguins via le cathéter jugulaire (8 prélèvements étalés sur 7h) après ingestion des caséines pour mesurer les variations plasmatiques de concentrations en acides aminés libres. Chaque porc recevra les deux types de caséines, avec un minimum de 3 jours entre deux expériences. Ces prélèvements seront réalisés dans leur logement habituel.

Ce protocole respecte la règle des 3R. Remplacement : Les mécanismes de vidange gastrique et de sécrétion d'hormones intestinales impliquent des communications entre l'estomac et le cerveau pour coordonner l'ensemble du mécanisme. Ces interactions ne peuvent être reproduites *in vitro* ou *in silico*, ce qui implique d'avoir recours à l'animal pour évaluer l'impact de la forme des caséines sur la vidange gastrique et les sécrétions hormonales. Le modèle animal utilisé est le plus approprié pour ce type d'exploration puisqu'il s'agit de l'espèce animale qui possède le système digestif le plus proche de l'Homme. Réduction : Le nombre d'animaux prévu (n=10 pour les vidanges et prélèvement sanguins rapprochés sur 2h et n=6 pour les prélèvements sanguins sur 7h) correspond au minimum statistique pour les données biologiques à analyser. Les deux formes de caséines seront testées sur chaque animal, renforçant la puissance statistique du modèle. Raffinement : La méthode de mesure de vidange gastrique par scintigraphie est une méthode non-invasive considérée comme la méthode de référence pour mesurer la vidange gastrique. Elle nécessite chez le porc une immobilisation pendant 2H dans un statif de Pavlov pour laquelle les animaux sont habitués pendant 2 à 3 semaines avant le début des expérimentations. Cette procédure indolore peut occasionner un stress temporaire durant les premières séances d'habituatation mais sont rapidement tolérées par l'animal. L'implantation du cathéter veineux pour les prélèvements de sang se fait sous anesthésie générale et analgésie peri-opératoire à l'aide Fentanyl et chlorhydrate de morphine en post-opératoire.

11507 Notre équipe de recherche a pour but de développer de nouveaux types de composés luminescents pour la détection de certains types cellulaires ou cancer en imagerie optique. En effet, les techniques d'imagerie utilisées pour le diagnostic (IRM, scanner, PET...) représentent un coût en temps (longue acquisition), en argent (appareil, produits de contraste...) et peuvent être nocifs (cas des femmes enceintes avec le scanner, problème d'allergie avec les produits de contrastes).

L'imagerie fluorescente n'est pas encore une technique d'imagerie très souvent utilisée pour le diagnostic car les tissus ont la propriété d'être auto-fluorescent dans la lumière visible. Pourtant elle offre une alternative et une complémentarité aux autres techniques couramment utilisées : optimisation de la sensibilité, besoin de faible quantité de composés et le coût de l'appareil est moindre.

Nous avons développé un nouveau composé luminescent fonctionnalisé pour cibler les cellules nécrotiques du foie. Lors des expérimentations *in cellulo*, ce composé a montré une bonne sélectivité pour les cellules nécrotiques par rapport aux cellules saines. Afin d'évaluer son efficacité de ciblage *in vivo* nous avons besoin de travailler sur l'animal, dans un modèle de souris avec nécrose du foie. Ce modèle de nécrose du foie est dommageable pour les souris cependant l'induction de la nécrose du foie est légère. Nous n'attendons pas que les procédures atteignent les points limites, cependant un scoring a été mis au point pour évaluer la souffrance et considérer les points limites.

Le composé synthétisé est dérivé d'une famille de molécules reconnues comme non toxiques, non immunogènes et excrétées par voie urinaire. La concentration du composé qui sera injectée a été déterminée par une étude de toxicité cellulaire comme induisant au maximum 10% de mortalité cellulaire et ne devrait pas par conséquent entraîner de douleur chez l'animal.

Sachant que le composé a été fonctionnalisé afin de cibler les cellules nécrotiques du foie, nous nous attendons à avoir un signal que dans les zones endommagées du foie. Ceci sera confirmé par une étude histologique des foies.

Cette étude ne peut être faite que chez l'animal puisque les expérimentations au niveau cellulaire ne reflètent pas l'aspect physiologique dans le développement de la nécrose du foie chez l'Homme. Cette étude nécessitera 20 souris. L'approche par imagerie permet ainsi de réduire le nombre de souris mais aussi leur souffrance (anesthésie) ce qui est en parfait accord avec la règle des 3R.

Enfin, ce projet n'a pas encore été réalisé auparavant (nouveau composé) et l'objectif final est la création d'un nouveau marqueur de cellules nécrotiques du foie qui sera utilisé chez l'Homme.

11508 La régénération est un processus cellulaire absolument indispensable pour la réparation d'un tissu après une lésion. Les muscles squelettiques sont normalement pourvus d'une capacité régénératrice à l'exception du cœur. Or cette capacité de régénération cardiaque n'existe chez les mammifères pendant une fenêtre de temps très restreinte après la naissance alors qu'elle persiste à l'adulte chez les poissons. L'objectif de ce projet est de comprendre en quoi la structure du cœur néonatal est pourvue d'une capacité régénératrice et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour réactiver ce processus dans le cœur adulte de mammifères après un infarctus du myocarde.

La régénération cardiaque met en jeu une communication précise entre plusieurs types cellulaires que nous ne pouvons étudier que sur un modèle *in vivo* afin de maintenir cet environnement particulier. Le modèle mammifère choisi est la souris car l'utilisation de plusieurs lignées de souris transgéniques nous permet de cibler facilement les différentes cellules impliquées. Les mécanismes impliqués lors de la régénération cardiaque seront analysés après une lésion chirurgicale réalisée sur le cœur de souris nouveau-nées. Grâce à l'expérience acquise en chirurgie adulte sur des projets précédents, nous avons optimisé les conditions expérimentales pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Ainsi ce projet utilisera un total de 770 souris transgéniques.

Les souris sont élevées en groupes sociaux, dans un environnement enrichi par la présence d'objets variables d'une semaine à l'autre. L'animalerie possède un agrément et les personnels de l'animalerie comme de l'équipe de recherche sont habilités à travailler et à manipuler ces animaux dans des conditions optimales. Les animaux après chirurgie, sont placés dans une pièce séparée post-opératoire et surveillés quotidiennement pour détecter le moindre signe de souffrance suivant une échelle prédéfinie et agir lorsque les critères d'interruption prédéfinis sont atteints, noter dans le registre des animaux les observations faites et les actions entreprises.

11509 L'acide rétinoïque (ATRA) est essentiel car c'est une vitamine. Notre recherche consiste à comprendre les mécanismes que l'ATRA contrôle pour exercer ses effets. Le testicule, siège de la spermatogenèse, est notre modèle d'étude car son fonctionnement est altéré en cas de carence en ATRA, et il intègre de nombreuses problématiques (cellules souches ; identité, destin, prolifération et morphogenèse cellulaire ; divisions mitotique et méiotique, mort cellulaire).

La spermatogenèse est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs types cellulaires du testicule. Notre étude vise à comprendre les effets de l'ATRA dans un système physiologique. Seule une approche expérimentale avec des animaux permet de répondre à ces questions. Le remplacement par un système *in vitro* (1er R de la règle des 3R) est impossible.

La souris est le modèle de choix car sa spermatogenèse dépend de l'ATRA, comme chez l'homme. Nous combinons des approches génétiques et pharmacologiques pour comprendre comment l'ATRA exerce ses effets. Les protocoles mis en œuvre permettent d'induire une ou plusieurs mutations chez la souris, uniquement dans un type cellulaire choisi.

Le nombre d'animaux requis est de 60 souris au maximum. Ce nombre est calculé au plus juste pour satisfaire aux exigences en matière de réduction du nombre d'animaux utilisés tout en assurant la qualité des résultats obtenus et la robustesse de leur validité statistique. La réduction du nombre d'animaux (2e R de la règle des 3R) est donc appliquée dans notre projet.

Le phénotype se limitant à la stérilité des mâles, les animaux ne souffrent pas des mutations génétiques générées. Comme l'exige l'éthique, dans tous les cas, des protocoles d'anesthésie et

d'analgésie appropriés seront appliqués. Le bien-être est surveillé en permanence et toute altération du comportement des animaux (souffrance, angoisse) sera immédiatement discutée avec les responsables de la structure du bien-être animal (SBEA) pour prendre les mesures correctives nécessaires. Nous respectons ainsi le raffinement (3e R de la règle des 3R) dans ce projet.

11510 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune inflammatoire du système nerveux central. Il s'agit de la cause la plus fréquente d'invalidité neurologique chez les jeunes adultes. Le diagnostic repose sur la présence de divers symptômes cliniques et de signes radiologiques en imagerie par résonance magnétique (IRM), extrêmement sensible à la détection de lésions de la substance blanche cérébrale (myéline). Cependant, les mesures classiques en IRM (nombre, type et localisation des lésions) restent peu corrélées avec l'invalidité et manquent de valeur pronostique. Plusieurs thérapies anti-inflammatoires sont utilisées en première ligne, mais ont peu d'effet sur l'évolution du handicap à long terme. De nouveaux traitements visent à promouvoir la réparation de la myéline, avec l'espoir de restaurer certaines capacités cérébrales. Un défi urgent à relever pour l'évaluation clinique de ces nouveaux traitements est d'identifier une mesure fiable des variations de quantité de myéline, c'est-à-dire un biomarqueur d'imagerie *in vivo* de la myéline. Certaines techniques avancées d'IRM sont prometteuses mais pas totalement sélectives de la myéline ni assez standardisées pour une large utilisation. La tomographie par émission de positons (TEP), une technique de médecine nucléaire consistant à injecter un traceur radioactif reconnaissant une cible donnée (radiotracer), peut permettre une détection directe des modifications de la myéline avec la sensibilité et la spécificité requises. Un premier radiotracer marqué au carbone-11, a montré la faisabilité et le potentiel de cette approche pour suivre l'évolution du contenu en myéline dans les lésions de la SEP. Pour étendre l'utilisation clinique de la TEP, des traceurs radiomarqués au fluor-18 sont nécessaires, car la courte demi-vie du carbone-11 limite la technique à quelques centres équipés d'un cyclotron. L'objectif de ce projet est donc de progresser vers une deuxième génération de radiotraceurs de la myéline, radiomarqués au fluor-18, et démontrant que la TEP de la myéline apporte de nouvelles informations non disponibles et complémentaires aux techniques avancées d'IRM. L'induction d'une encéphalite auto-immune chez le singe va permettre de comparer directement ces radiotraceurs fluorés au radiotracer standard carboné, ainsi qu'à différentes techniques IRM avancées (c'est-à-dire supposées spécifiques à la myéline). Cette comparaison de différentes techniques d'imagerie de la myéline n'a jamais été réalisée.

Durée du projet - effets néfastes attendus.

Au cours des 5 années de ce projet de recherche fondamentale, 30 macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*) issus d'un élevage agréé seront utilisés pour l'évaluation de 5 radiotraceurs au maximum. Une première procédure, de classe légère, concernant 5 animaux visera à définir la meilleure stratégie de quantification des images en l'absence de pathologie (1 animal contrôle pour chaque radiotracer candidat). Les animaux contrôles feront chacun l'objet de 3 sessions d'imagerie. Dans la deuxième procédure, de classe sévère, 25 animaux au maximum (5 par radiotracer) recevront des injections sous-cutanées répétées chaque mois, dans le but de provoquer l'apparition de lésions cérébrales démyélinisantes et de symptômes moteurs associés, avec notamment une perte des capacités motrices ou un trouble de la coordination motrice (parésie, ataxie modérée, tremblements, chutes). Une évaluation clinique individuelle (signes neurologiques, de douleur et de stress) sera réalisée quotidiennement, éventuellement par vidéo, tout au long de cette procédure. Un score clinique sera attribué afin de quantifier la gravité des symptômes induits et de prendre les mesures de soutien nécessaires. Ces animaux bénéficieront de 2 examens TEP/IRM réalisés sous anesthésie générale en fonction de l'évolution de leur score clinique (2 sessions d'imagerie prévues par animal). L'euthanasie des animaux de la procédure 1 et 2 sera effectuée en fin de suivi d'imagerie, ou précocement si les animaux atteignent les points limites définis.

Dans tous les cas, le cerveau sera prélevé pour valider les observations faites en imagerie.

Application des 3R.

Remplacer : ce projet fait suite à un travail sur le rat, qui a identifié une famille de radiotraceurs candidats prometteurs marqués au fluor-18. La décision de mener une évaluation clinique chez les

patients avec l'un de ces radiotraceurs requiert une preuve de concept chez un gros animal, sur lequel tester des méthodes d'imageries translationnelles. Le macaque cynomolgus possède un volume de substance blanche comparable à l'homme, permettant l'utilisation d'équipements dédiés aux patients humains (TEP-IRM) et constitue une espèce de référence pour les modèles expérimentaux de sclérose en plaque chronique. D'autres modèles tels que la souris ou le marmouset ne remplissent pas toutes ces conditions.

Réduire : 6 animaux, dont 1 contrôle, sont prévus pour chaque radiotraceur candidat, ce qui est le minimum permettant de conclure sur la validité d'un biomarqueur d'imagerie, compte-tenu de la variabilité attendue du modèle.

Raffiner : les animaux seront hébergés par groupes sociaux dans des volières conformes aux recommandations et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal, avec rotation du matériel pour renouveler l'intérêt des animaux. Le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations. L'imagerie IRM/TEP sera effectuée de manière simultanée, au cours d'une même anesthésie. Un traitement anti-inflammatoire sera administré pour éviter l'aggravation rapide des symptômes et l'atteinte précoce d'un point limite.

11511 Les maladies inflammatoires (MI) chroniques représentent la troisième cause de mortalité dans les pays développés, et la 2ème ligne de dépense pour les systèmes de santé internationaux. Ces maladies parfois très distinctes sur le plan phénotypique (psoriasis, maladies inflammatoires de l'intestin, vascularites, lupus, sclérose en plaque...) se caractérisent en fait par des traits physiopathologiques communs. Par exemple, les prédispositions génétiques (polymorphismes de gènes retrouvés associés aux MI) et les facteurs immunologiques impliqués dans la genèse des lésions sont partagés par les MI. Il n'est donc pas surprenant de voir que les traitements de ces maladies sont également partagés.

Notre équipe a pu démontrer qu'une molécule, le FASL soluble, était capable de favoriser la migration de cellules pro-inflammatoires au sein de tissus inflammatoires. La compréhension des mécanismes impliqués dans l'activation de ces cellules, leur prolifération et leur migration est donc très importante.

Dans cette étude nous avons montré dans un modèle murin de lupus que le blocage de cette molécule améliorait les paramètres cliniques et biologiques de la maladie. Plus récemment, dans une étude en cours de publication, nous avons 1/ généré un peptide capable de bloquer *in vitro* et *in vivo* (modèle de lupus) le FASL soluble 2/ identifié des molécules (famille des anti-proteases du VIH) capables d'inhiber le FASL soluble.

Nos résultats plus récents et non publiés suggèrent que le FASL soluble pourrait avoir un rôle dans d'autres maladies inflammatoires. En effet nous retrouvons des taux élevés de cette molécule dans le sérum de patients affectés de vascularite, et de sclérodermie systémique. Afin de valider nos observations chez les patients, il est important d'étudier si des modèles animaux récapitulant les maladies humaines se caractérisent par cette même observation et si cette molécule constitue une cible thérapeutique intéressante. Ainsi, pour les vascularites, nous utiliserons un modèle murin induit de glomérulonéphrite (néphrite néphrotoxique = NTN), une caractéristique des vascularites auto-immunes à ANCA (anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles).

Pour ce faire, nous injecterons un serum néphrotoxique (toxique pour le rein) aux souris puis nous les traiterons pour ralentir la glomérulonéphrite induite. Après leur euthanasie nous réaliserons une étude histologique des reins des souris pour évaluer la dégradation rénale. Nous récolterons du plasma pour y doser le sFasL, l'urée et la créatinine. Nous récolterons également les urines des animaux, avant et après traitement pour évaluer l'évolution de la fonction rénale au cours du temps en dosant l'albumine et la créatinine.

Notre équipe a récemment montré que les plaquettes étaient activées chez les patients porteurs d'un lupus systémique, mais aussi de vascularite. Ces plaquettes activées peuvent interagir avec des cellules régulatrices de la réponse immunitaire en bloquant leurs fonctions régulatrices. Nous avons identifié la P-sélectine comme la protéine plaquettaire responsable de la dysfonction des

cellules régulatrices, retrouvée dans de nombreuses maladies auto-immunes comme les vascularites à ANCA. Nous étudierons donc l'intérêt du blocage de la P-sélectine dans plusieurs modèles murins de maladies auto-immunes dont les vascularites. Pour tenter de rétablir la balance du système immunitaire sans promouvoir le risque infectieux ou thrombotique. Notre équipe a récemment montré que les plaquettes étaient activées chez les patients porteurs d'un lupus systémique, mais aussi de vascularite. Ces plaquettes activées peuvent interagir avec des cellules régulatrices de la réponse immunitaire en bloquant leurs fonctions régulatrices. Nous avons identifié la P-sélectine comme la protéine plaquettaire responsable de la dysfonction des cellules régulatrices, retrouvée dans de nombreuses maladies auto-immunes comme les vascularites à ANCA. Nous étudierons donc l'intérêt du blocage de la P-sélectine dans ce modèle de vascularite pour tenter de rétablir la balance du système immunitaire sans promouvoir le risque infectieux ou thrombotique.

Afin de réaliser l'ensemble de nos expériences, 312 souris sont demandées sur une période de 3 ans. Des méthodologies de culture cellulaire et de modélisation *in vitro* ont été également implémentées afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux. Mais seul un modèle murin récapitulant les éléments de la physiopathologie des vascularites auto-immunes à ANCA observée chez l'homme, permettra de vérifier l'efficacité thérapeutique et l'absence de toxicité cellulaire de trois molécules, pour le développement d'essais précliniques chez l'Homme.

Dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été défini d'un point de vue statistique afin de réduire et optimiser leur nombre. Finalement, pour respecter la notion de raffinement, le bien-être et la souffrance de nos animaux seront pris en compte de leur naissance à leur mort et évalués selon les critères de Lloyd et al. (Lab Animal, 1998), afin d'éliminer ou de réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ou tout dommage durable susceptible d'être infligé aux animaux. Ainsi pour chaque procédure impliquant une douleur supérieure à celle d'une piqûre, les animaux seront anesthésiés.

11512 La nanomédecine est un domaine en plein essor en oncologie. Parmi les nanomédicaments, les formes liposomales sont les plus étudiées et les plus représentées sur le marché. En effet, de par leurs propriétés (composition lipidique et taille < 200nm), les liposomes sont biocompatibles et permettent d'encapsuler des molécules thérapeutiques, profitant ainsi d'un temps de résidence dans l'organisme allongé et d'un ciblage tumoral augmenté réduisant l'atteinte des cellules saines. L'accumulation intratumorale peut également être majorée grâce à l'emploi d'agent de ciblage des cellules cancéreuses, tels que les anticorps.

Cette amélioration de la balance efficacité/toxicité repose alors sur une optimisation du profil pharmacocinétique.

Dans ce contexte, nous avons développé dans le cancer du sein un liposome de docétaxel greffé en surface par du trastuzumab et avons montré *in vitro* et *in vivo* son efficacité supérieure en comparaison aux traitements actuels.

Afin de valider notre hypothèse de départ et de décrire la pharmacocinétique de cette entité, 82 souris nude femelles seront greffées sur un mode orthotopique, dans le tissu graisseux sous mammaire (modèle dit du Mammary Fat Pad) avec des tumeurs d'origine humaine de cancer du sein de type MDA-MB231. Dix-huit jours après la greffe tumorale, les souris seront traitées et nous prélèverons les échantillons sanguins ainsi que les organes spécifiques de distribution (tumeur, foie, rate, poumons, cœur et reins) à six temps définis (5min, 30min, 1H, 6H, 24H et 72H). Ces échantillons seront dosés par chromatographie liquide afin de connaître leur concentration en docétaxel. La courbe de pharmacocinétique de notre liposome greffé ainsi que sa biodistribution seront comparées à celle du docétaxel libre et du liposome de docétaxel non greffé, afin de démontrer l'optimisation de son profil pharmacocinétique et l'intérêt de la greffe du trastuzumab.

Cette étude a été conçue pour répondre à deux interrogations : 1. Démontrer que le traitement par liposome greffé reste plus longtemps dans l'organisme que le docétaxel libre. 2. Démontrer que le traitement par liposome greffé s'accumule davantage au site tumoral que le docétaxel libre et le liposome non greffé.

Le nombre d'animaux utilisé a été calculé et maintenu minimal tout en générant le maximum d'information exploitable scientifiquement. Les souris seront 5 par cage et stabulées dans une armoire à température et pression contrôlée. Pour enrichir leur environnement, les souris disposeront de dômes et de coton stériles.

La nature des expérimentations conduites (administrations IV et croissance tumorale sur 18 jours) ne devrait pas entraîner de douleurs particulières, mais seront prises en charge préventivement par l'administration de paracétamol. Les points limites sont la croissance tumorale au-delà d'un volume de 1500 mm³ (qui ne devrait pas être atteint) et tout signe de détresse ou de souffrance recherchés avec une grille de score. Les prélèvements sanguins et d'organes seront faits sous anesthésie (Sevoflurane) et sans réveil pour l'animal. A ce titre cette étude s'inscrit pleinement dans le respect de la règle des 3R, en accord avec l'article 5 chapitre II de l'arrêté du 21 février 2013.

11513 Le surpoids et l'obésité chez le chien représentent un problème d'importance croissante et la diminution de la prévalence de cette affection est un enjeu majeur de la médecine vétérinaire.

Le rôle du microbiote sur le risque de surpoids a été révélé par la comparaison du microbiote de souris obèses à celui de souris saines. Alors qu'elles recevaient toutes le même régime, l'on a mis en évidence, d'une part, une différence de population bactérienne et, d'autre part, une augmentation de la masse grasse après conventionnalisation chez des souris initialement axéniques, et ce malgré une prise alimentaire faible.

L'implication de certaines populations bactériennes dans le risque de surpoids a été confirmée par des manipulations de transfert de microbiote fécal. Le transfert du microbiote de souris obèses a provoqué une prise de poids chez des souris axéniques. Le transfert du microbiote de souris obèses puis ayant maigri après une intervention de chirurgie bariatrique a été suivi d'une perte de poids chez des souris obèses non opérées. Chez l'homme, la transplantation du microbiote d'un donneur en bonne santé mais en surpoids s'est ensuivi d'une prise de poids chez le receveur. Enfin, le transfert de microbiote d'individus minces a provoqué une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez des receveurs souffrant du syndrome métabolique.

Parmi les mécanismes pouvant expliquer l'effet du microbiote, l'on a notamment évoqué une meilleure extraction énergétique des aliments par absorption des acides gras à chaîne courte (AGCC) issus de la fermentation colique ainsi que l'effet de ces derniers sur le métabolisme des adipocytes. Le microbiote est, par ailleurs, impliqué dans la survenue des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et dans l'instauration d'une inflammation systémique. Cet effet s'expliquerait par le rôle de certains microorganismes dans le maintien ou l'altération de l'intégrité de la barrière intestinale. Une modification du microbiote, en diminuant l'expression des protéines des jonctions serrées, augmenterait la perméabilité intestinale et rendrait ainsi possible le passage transpariétal de composants des parois bactériennes qui induiraient un processus inflammatoire subclinique responsables à son tour, d'une baisse de la sensibilité à l'insuline. Enfin, le lien entre microbiote et sensibilité à l'insuline a été établi par des manipulations de transfert de microbiote.

Tout intervention permettant une perte de poids, une correction de l'inflammation systémique, et/ou un recouvrement de la sensibilité à l'insuline apparaît nécessaire pour corriger les perturbations liées au surpoids chez le chien. Parmi les alternatives thérapeutiques, les interventions nutritionnelles ont montré leur efficacité.

Dans la présente étude, nous envisageons de tester l'efficacité de différentes suppléments visant à corriger les perturbations liées au surpoids chez le chien. Une supplémentation en polyphénols, aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, ou en prébiotiques, substrats des microbiotes intestinaux, ou extrait végétal pouvant modifier la digestion des glucides et par là même leur absorption semble pouvoir être bénéfique.

L'étude sera menée sur 30 chiens, répartis en trois groupes de 10 qui seront tous, avant le protocole alimentaire, nourris avec un régime hyperlipidique et maintenus à un niveau de surpoids stable depuis 6 semaines. Dix chiens recevront l'aliment à un niveau maintenant leur poids stable pendant 12 semaines (groupe témoin), dix chiens le recevront supplémenté en polyphénols (extrait de *Curcuma longa*) et en prébiotique (nutriose) au même niveau énergétique pendant 12 semaines,

dix chiens le recevront supplémenté en prébiotique (nutriose) et en inhibiteur de l'amylase (extrait de haricots blancs) au même niveau énergétique pendant 12 semaines.

Avant et à la fin du régime, la physiologie de l'hôte sera appréciée par la détermination de facteurs systémiques (poids, déterminants de la prise alimentaire, inflammation), de facteurs associés à l'épithélium intestinal, de la réponse de l'organisme à des stimulations exogènes (challenge tests). Par ailleurs, l'analyse du microbiote devant nous permettre de mieux comprendre les modifications liées à l'amélioration de la santé des chiens, seront déterminées, à partir de selles fraîches, les caractéristiques des populations bactériennes et du métagénome ainsi que de l'activité fermentaire.

Ce projet respecte la règle des 3R

Remplacer : Cette étude entre dans le cadre d'une recherche de solutions nutritionnelles en médecine vétérinaire. Le chien est de ce fait l'espèce cible. De plus aucune manipulation *in vitro* ne permet de mesurer l'influence du régime sur le microbiote fécal, et sur la physiologie de l'hôte.

Réduire : l'étude est organisée en carré Latin, ce réduit le nombre d'animaux et permet une analyse statistique compte-tenu des variations interindividuelles importantes

Raffiner : le bien-être des animaux sera surveillé par leur observation quotidienne. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales sont adaptées pour ne pas l'altérer. Pendant les procédures expérimentales, l'analgésie est assurée par la méthadone ; sont mesurées en permanence les fréquences cardiaque et respiratoire, la saturation en O₂ dans le sang, la pression artérielle par Doppler et la température ; les animaux sont installés sur un tapis chauffant.

11514 Le métabolisme du fer est régulé par l'hepcidine, un peptide produit par le foie et éliminé par le rein. Cependant, le rôle du rein dans l'homéostasie du fer n'est pas encore bien élucidé. Des données suggèrent qu'en plus de l'élimination de l'hepcidine, le rein peut soit réabsorber le fer soit l'éliminer dans les urines. Le rein exprime également une quantité faible de l'hepcidine. Cependant, le rôle de cette synthèse reste à ce jour non exploré. Nos projets sont : Axe 1) Elucider l'implication de l'hepcidine rénale dans la protection contre les infections urinaires. Axe 2) Elucider l'implication de l'hepcidine rénale dans la synthèse de l'EPO et la régulation de l'érythropoïèse. La génération de 2 nouveaux modèles de souris dont le gène de l'hepcidine est soit invalidé (le modèle ZOLA), soit surexprimé (le modèle NIDA) spécifiquement dans le rein, est d'une grande utilité dans la réalisation de ces deux projets. Dans l'axe 1), l'utilisation de ces deux modèles va nous permettre de démontrer l'importance de la présence de l'hepcidine dans les voies urinaires pour protéger contre les infections et de proposer l'hepcidine comme nouveau moyen thérapeutique dans ces infections. Dans l'axe 2), l'utilisation de ces mêmes modèles va nous permettre de comprendre pourquoi, dans les maladies rénales, la production de l'EPO est altérée et les patients sont anémiques. Dans ce cas l'hepcidine pourrait servir comme moyen thérapeutique de l'anémie des maladies rénales chroniques et des maladies inflammatoires en générale. Ces deux projets nécessitent un total de 840 souris et sera mené sur une durée 5 ans. La démarche scientifique a été établie afin de respecter la règle des 3R :

1- Réduction : Toutes les expérimentations réalisées utiliseront le nombre d'animaux minimum de façon à tirer des conclusions statistiquement fiables. Les groupes seront comparés par des tests non paramétriques de type Mann- Withney (comparaison de deux groupes), ou Kruskal-Wallis (comparaison de plus de deux groupes). Selon les données de la littérature, un effectif de 10 souris par groupe est nécessaire afin d'obtenir suffisamment de puissance dans ce type de comparaison. Par ailleurs, au moment de l'euthanasie, des organes seront prélevés pour être analysés dans le cadre de ces deux projets mais également conserver pour des projets futurs et/ou en collaboration avec des équipes menant des recherches complémentaires aux nôtres.

2- Remplacement : Les mécanismes étudiés reposent sur des interactions entre organes au sein d'un système intégré, impliquant de recourir à l'animal. En effet, l'hepcidine est produite par le foie, le rein et plusieurs autres organes. Le métabolisme du fer repose sur l'intestin, le foie, la rate et le rein et enfin, l'érythropoïèse implique le rein et la moelle osseuse. Les études explorant un seul organe seront réalisées d'abords sur des cultures cellulaires avant d'avoir recours à la souris.

3- Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place des conditions optimales pour éviter l'inconfort et la douleur des souris. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification afin de favoriser leur bien-être. Les deux modèles de souris NIDA et ZOLA ne présentent aucun phénotype dommageable puisque l'hepcidine rénale est induite et elle est donc non présente dans les conditions basales. Lors des expériences, les signes extérieurs de souffrance (état prostré, poils hérissés, yeux fermés) seront les critères de points limites à surveiller. Dès apparition, la souris sera euthanasiée. Il est prévu d'euthanasier les souris en fin de projet.

L'hepcidine est une cytokine inductible, elle est maintenue extrêmement bas par l'organisme pour assurer son inactivité dans les conditions physiologiques basales. Dans le rein, elle est d'autant plus faible voir quasi inexistante. Des données de la littérature montrent que le niveau de l'hepcidine dans le rein est 100 fois plus faible que dans le foie, le siège de la production de l'hepcidine. Dans le cœur ou le niveau de l'hepcidine est également 100 fois plus faible, des souris dépourvues ou surexprimant l'hepcidine dans le cœur n'ont aucun phénotype dommageable. Enfin, le peu d'hepcidine produit par le rein est évacué instantanément dans les urines. Ainsi, il est certain que le phénotype de ces souris n'est pas dommageable.

11515 Lors de la fabrication des aliments destinés aux porcs, les différentes matières premières impliquées dans la formule sont broyées et mélangées pour la constitution d'une farine homogène. Cette farine peut par la suite subir une granulation, traitement technologique qui se caractérise par le passage forcé de la farine dans une presse, en présence de vapeur d'eau et induisant une élévation de température de l'aliment. Ce traitement technologique induit une cuisson de l'aliment et une action mécanique sur ses constituants, qui permet d'améliorer l'utilisation digestive des nutriments (protéines, glucides, lipides) et de l'énergie de l'aliment, se traduisant par une amélioration des performances de l'élevage de 5 à 10%. L'amélioration de l'utilisation digestive des nutriments devrait également être associée à une modification de la vitesse de disponibilité des nutriments à l'animal, susceptible de modifier la dynamique de son métabolisme. Le projet sera conduit sur 68 porcs en croissance pour mesurer la cinétique d'utilisation digestive et la cinétique d'utilisation métabolique. Le projet a recours au porc qui est l'espèce-cible de l'étude et qui ne peut pas être remplacé par un autre modèle expérimental. Le projet est élaboré dans le respect de la règle des 3R :

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

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

- Raffinement : afin de limiter l'hébergement en cage à digestibilité limitant les mouvements de l'animal, les animaux seront d'abord hébergés dans des cages leur permettant de se retourner. Les cages seront placées de façon à permettre un contact visuel, sonore, olfactif et tactile entre les animaux. Lors des mesures d'utilisation métabolique, les animaux seront hébergés dans des cages de grande taille et auront en permanence un contact auditif avec leurs congénères.

11516 L'hémophilie est une maladie hémorragique héréditaire. La principale complication clinique est l'atteinte articulaire, principalement localisée aux genoux, et causée par la répétition des saignements intra-articulaires (hémarthrose) (1-2). Le traitement est basé sur la perfusion intraveineuse de facteur de la coagulation manquant. La prophylaxie par des injections régulières de concentrés de facteur, ayant comme objectif d'améliorer le taux de facteur anti-hémophilique circulant, est le seul traitement qui a fait ses preuves pour préserver les articulations et réduire le risque de saignement mettant le pronostic vital en danger. Récemment un anticorps monoclonal humanisé, bispécifique, mimant l'action du facteur VIII activé a été mis sur le marché (emicizumab). Cette molécule présente plusieurs avantages : elle est administrée par voie sous-cutanée, elle est efficace chez les hémophiles A avec ou sans allo-anticorps anti-facteur VIII et n'induit pas d'inhibiteurs. La prophylaxie par emicizumab a fait preuve de son efficacité. En revanche, en cas

de saignement intercurrent, survenu lors de la prophylaxie emicizumab, il est nécessaire de traiter les patients par un traitement combiné par emicizumab+facteur(s) de coagulation. Le traitement combiné a été responsable de complications thrombotiques majeures chez plusieurs patients. Ainsi, l'utilisation de traitements adjuvants qui pourraient améliorer l'efficacité et de permettre d'éviter la survenue de saignement intercurrent et de réduire ainsi le recours au traitement combiné par emicizumab+facteurs de coagulation présente un intérêt clinique majeur pour la sécurité du traitement par emicizumab.

Objectifs scientifiques et/ou perspectives d'application médicale :

Le projet actuel a comme objectif de comparer l'efficacité de la prophylaxie par emicizumab avec celle d'une stratégie combinée emicizumab et acide tranexamique. L'acide tranexamique est un anti-fibrinolytique qui permet de protéger le caillot de fibrine formé contre la fibrinolyse, stabilise mieux le caillot et retarde ainsi l'élimination de caillots formés. Il est souvent prescrit pour des saignements mineurs chez les patients ayant des déficits de coagulation. L'acide tranexamique, contrairement à l'emicizumab, a un coût très modeste.

Le projet prévoit 26 souris hémophiles A (20 pour le projet expérimental et 6 pour l'élevage).

Un protocole d'arthropathie hémophilique standardisé chez les souris hémophiles a déjà été mis au point. Le protocole consiste à effectuer un traumatisme sur un genou de souris hémophiles A et B par la ponction à l'aide d'une aiguille. Ce traumatisme entraîne une hémarthrose dans 95% des cas. Par analogie avec la survenue d'une hémarthrose chez le patient hémophile, un traitement antalgique sera effectué pendant au moins 5 jours par un analogue de la morphine. Nous allons utiliser ce modèle pour évaluer l'efficacité des 2 stratégies thérapeutiques contre le risque de saignement articulaire.

Groupe 1 : 10 souris hémophiles A vont recevoir une injection sc unique d'emicizumab à la dose habituelle de 1,5mg/kg

Groupe 2 : 10 souris hémophiles A vont recevoir une injection sc unique d'emicizumab à la dose habituelle de 1,5mg/kg et d'acide tranexamique à la dose de 10mg/kg soit 0.25mg pour des souris de 25g

15 min après l'injection, le genou de la patte arrière droite sera traumatisé selon le protocole établi. Le genou de la patte arrière gauche (non exposé au traumatisme) servira de contrôle normal.

2 jours après le traumatisme, une étude des articulations de genoux sera effectuée à l'aide d'IRM.

Il est important de préciser que la souris hémophile, paradoxalement à la forme humaine de cette altération génétique, n'est pas victimes de saignement spontané et tout saignement provoqué sur la souris hémophile est résolutif sans prise en charge particulière.

Afin d'obtenir des résultats les plus fiables possibles, ce projet répond aux mieux aux critères de remplacement, de réduction et de raffinement :

1) Remplacement : Dans le cadre de notre projet, une étude in vitro a déjà été effectuée et montré des résultats encourageants. La nécessité d'un modèle animal est maintenant justifiée par le fait qu'un modèle vivant, dynamique et doté d'un système vasculaire est nécessaire pour des études sur la coagulation sanguine. La souris est un modèle éprouvé, fiable et de nombreuses lignées hémophiles A et B sont disponibles.

2) Réduction : le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit à son minimum sans compromettre la significativité statistique de l'expérimentation.

3) Raffinement : toutes les mesures seront prises pour préserver le bien-être de l'animal. Les conditions de l'élevage, de l'hébergement, des soins et des méthodes utilisées pour chaque étape de l'expérimentation se feront sous condition de minimiser douleurs, souffrance, angoisse et dommages durables que pourraient ressentir l'animal (anesthésie, analgésie, points limites...).

Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal et à l'observation des signes cliniques fondamentaux, notamment dans le domaine de la coagulation. Toutes les personnes intervenant dans ce projet auront été préalablement formées à ce genre de protocole.

11517 Les cellules du sang assurent l'oxygénation des tissus et orchestrent la défense immunitaire. Elles se développent continuellement dans la moelle osseuse (MO) à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) tout au long de la vie des individus. Les mécanismes biologiques qui gouvernent le maintien de ces CSH et la différenciation de celles-ci ne sont pas encore totalement élucidés. La perturbation de ces mécanismes participe au développement de maladies auto-immunes et de leucémies. Une meilleure compréhension de ceux-ci permettra de développer des cibles et des stratégies thérapeutiques permettant de traiter les patients atteints de ces syndromes. Notre laboratoire s'intéresse à une famille de protéines appelée Ikaros et composée de 5 membres Ikaros, Helios, Aiolos, Eos et Pegasus. Ces protéines participent au contrôle de l'expression génique. De manière intéressante, les protéines Ikaros et Helios sont présentes en grande quantité dans les CSH suggérant que ces protéines ont une fonction dans la biologie de ces cellules. Il a été montré préalablement que des mutations génétiques conduisant à la perte de Ikaros conduit à un dysfonctionnement des CSH. Cependant, le rôle de Helios n'a pas encore été décrit pour les CSH et reste à être caractériser dans ces cellules.

Pour répondre à cette question notre laboratoire a généré une lignée de souris portant une mutation génétique qui entraîne la perte d'expression de Helios (souris He^{-/-}). De manière préliminaire, nous avons observé que le nombre de CSH augmente chez les souris He^{-/-} suggérant que ce facteur est important pour l'homéostasie de ces cellules. D'autre part, l'analyse des différentes cellules constituant le sang des souris présente des anomalies indiquant que Helios est nécessaire au bon développement des cellules sanguines.

Ce projet cherche à déterminer la fonction de la protéine Helios dans les CSH ainsi qu'au cours de la différenciation de ces cellules. Pour cela nous allons réaliser différentes expériences de transplantations de CSH issues de souris He^{-/-} dans des souris sauvages dépourvues de cellules sanguines par irradiation. Le sang des souris ainsi reconstituées sera analysé et permettra de déterminer le rôle de Helios dans les CSH.

Afin de respecter la règle des 3R, une réduction du nombre d'animaux utilisés a été décidée.

Pour répondre à cet objectif, et afin de pouvoir réaliser des tests statistiques (Student t-test), nous prévoyons d'analyser des groupes de 6 souris/ conditions, soit 285 souris pour le projet global (voir procédures expérimentales). Pour répondre à l'objectif de raffinement, les souris seront hébergées à plusieurs dans des cages de taille réglementaire, en ne dépassant pas le nombre maximal autorisé de souris par cage (souris rassemblées en groupes sociaux), et dans des cages comportant des enrichissements (nids). Enfin, les souris seront observées régulièrement et les dispositions adéquates seront appliquées si la souffrance des animaux devait atteindre les points limites. La règle du remplacement n'est pas applicable ici : en effet, nous devons avoir recours à un modèle *in vivo* afin d'étudier les cellules hématopoïétiques qui mettent en jeu des coopérations cellulaires multiples dans les organes hématopoïétiques tel que la moelle osseuse et le sang. Pour ces raisons, nous ne pouvons avoir recours à des modèles *in vitro*. En ce qui concerne les modèles *in vivo*, la souris est un modèle de choix pour l'analyse génétique et les expériences de transplantation de cellules.

11518 Le vieillissement de la population est un phénomène mondial et conduit à un éventail de pathologies telles que les maladies neurodégénératives, les cancers et les maladies cardiovasculaires. Afin de ralentir le processus de vieillissement et d'adopter une approche préventive de ces pathologies, il est absolument nécessaire d'identifier des biomarqueurs appropriés du vieillissement et de l'âge biologique afin d'accélérer le dépistage des molécules anti-vieillessement. Actuellement, le seul moyen de tester les propriétés anti-vieillessement d'une molécule est de voir ses effets sur la durée de vie des animaux. Cela commence généralement sur de petits modèles animaux tels que *C. elegans* et *Drosophila*, mais doit être testé sur des rongeurs pour valider l'effet sur les mammifères. Les études sur le vieillissement et l'espérance de vie durent aussi longtemps que la durée de vie des rongeurs et nécessitent un grand nombre d'animaux. L'identification de biomarqueurs de vieillissement précis permettrait de réduire jusqu'à dix fois la durée du traitement et le nombre d'animaux nécessaires à l'identification de molécules anti-vieillessement. Ce projet préliminaire vise

à définir l'effet des molécules anti-âge connues sur les biomarqueurs de vieillissement nouvellement identifiés.

Dans cette étude, 35 souris seront utilisées, réparties en 7 groupes. Deux groupes contrôles d'un âge différents (6 et 18 mois) serviront à valider les biomarqueurs de vieillissement. Six molécules anti-âge seront distribuées à 5 groupes test âgés de 18 mois dans l'eau de boisson ou par injection intra-péritonéale. Un groupe recevra 2 molécules anti-âge (une dans l'eau de boisson et une par injection).

Ne pouvant étudier les effets de molécules anti-âge dans un système *in vitro*, les modèles animaux rongeurs sont un outil de référence pour l'étude de l'impact de molécules distribuées sur des biomarqueurs à différents niveaux d'un organisme. La règle des 3R est appliquée ici pour les principes de réduction et de raffinement. Nous réalisons le protocole à la demande de notre client. Le nombre d'animaux est calculé selon son protocole expérimental, soit 35 souris. Examinant l'évolution morphologique du vieillissement des souris sur la durée de l'étude, les souris seront hébergées individuellement afin que les comportements sociaux de type bagarres et overgrooming / barbering n'interfèrent pas avec l'aspect observé des animaux. De ce fait, pour le bien-être des animaux, ceux-ci auront à disposition de l'enrichissement à ronger (bâton de bois) et de nidification. Ils seront placés dans des cages côte à côte leur permettant de garder un lien social (vue et odeurs). Les points limites seront observés tout au long du projet. Une surveillance des animaux sera réalisée quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur. Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la structure du bien-être animal.

11519 Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, il est nécessaire d'étudier une substance active chez l'animal. Malgré toutes les précautions mises en œuvre et les procédures mises en place pour mesurer l'innocuité d'un composé *in vitro* sur des modèles alternatifs, il arrive parfois qu'une toxicité se révèle chez l'animal lors des premières administrations dans les protocoles expérimentaux. Notre objectif est d'évaluer l'innocuité de produits pharmacologiques en cours de développement, candidats-médicaments, avant leur utilisation dans des protocoles expérimentaux complexes chez la souris. Cette démarche a pour but d'identifier tout effet indésirable et/ou épisode douloureux lié à l'administration des composés afin de garantir le bien-être des animaux qui seront engagés dans des modèles complexes pour les études pharmacologiques.

L'innocuité des composés sera étudiée en anticipant sur les futurs modèles utilisés pour confirmer leur efficacité et leur activité biologique. Chaque composé sera administré selon la posologie (voie(s) d'administration(s), dose(s), formulation(s), nombre d'administration) et chez la souche de souris prévue pour les futures études pharmacologiques.

Le but est d'engager un minimum d'animaux tout en assurant une évaluation efficace de l'innocuité des candidats-médicaments. Tous les composés dont l'innocuité ne sera pas avérée verront leur développement stoppé.

Les paramètres mesurés seront sélectionnés en fonction de l'activité biologique des composés et des éventuels effets secondaires déjà mis en évidence avec des composés de la même famille ou de même classe thérapeutique.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, l'innocuité des produits pharmacologiques sera évaluée chez la souris, car c'est l'espèce qui sera utilisée dans le cadre du développement des candidats médicaments, pour les études pharmacologiques futures. A ce jour, aucun modèle moléculaire et/ou cellulaire n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre de reproduire l'ensemble des phénomènes biologiques impliqués dans les mécanismes de dégradation, de transport et d'élimination des composés pouvant affecter l'activité des candidats médicaments. C'est pour cette raison qu'une approche *in vivo* est nécessaire pour le développement d'un candidat médicament pour déterminer l'innocuité des nouveaux médicaments avant de poursuivre leur développement.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance de l'animal. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes dans des cages de grande taille et enrichies de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état général des animaux. Lorsque la procédure nécessitera d'anesthésier l'animal, la souris sera ensuite placée sur un tapis chauffant afin de prévenir une hypothermie durant son réveil. La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux (évolution pondérale, l'apparence physique général, le comportement) sont mis en place afin de limiter le stress et la souffrance des animaux. La mise en évidence de tout trouble modifiant l'estimation précédente de la douleur sera suivi de l'arrêt de la procédure et de l'euthanasie de l'animal.

Réduire

Seuls les composés sélectionnés sur un ensemble de modèles alternatifs, dont l'activité biologique et leur innocuité a été prouvée sur les modèles cellulaires et possédant les caractéristiques physicochimiques adaptées pour être des « candidats-médicaments » seront évalué chez l'animal. La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet une évaluation efficace de l'innocuité d'un candidat-médicament à l'aide de 3 à 8 souris par condition, en fonction des paramètres mesurés. Il est prévu d'évaluer l'innocuité de 50 candidats-médicaments sur une période de 5 ans, soit un maximum de 2500 souris.

11520 Les tumeurs solides sont composées de 2 compartiments interdépendants : les cellules malignes et le stroma autour duquel elles évoluent. Ce stroma – clé de la progression tumorale et acteur majeur dans l'apparition de métastases – est constitué de différentes populations cellulaires dont les cellules souches/ multipotentes stromales mésenchymateuses (MSC). Alors que le rôle des MSC dans la croissance tumorale de certaines tumeurs et l'apparition des métastases a été décrit, à ce jour très peu de travaux existent pour expliquer comment ces cellules sont attirées par la tumeur.

Au laboratoire nous avons pu - pour la première fois - mettre en évidence, isoler et caractériser par cytométrie en flux, imagerie et tri cellulaire une sous-population rare de MSC – les MSC-M+ - dans le tissu adipeux (TA) et dans la moelle osseuse (MO) humaine. Nos résultats *in vitro* montrent que les MSC-M+ représentent une population rare qui serait les 1ères MSC à migrer sur le site tumoral et donc seraient détournées par la tumeur pour favoriser l'expansion tumorale. Nos mesures d'expression génique à grande échelle (Puces Affymetrix sur 10 patients différents) montrent que les cellules MSC-M+ surexpriment de nombreux ARNm codant pour des protéines impliquées dans la migration cellulaire. Ces protéines représentent donc des cibles moléculaires potentielles dont l'inhibition pourrait inhiber la migration des MSC au sein des tumeurs et par conséquent inhiber l'expansion tumorale. L'enjeu de notre recherche consiste à caractériser parfaitement cette sous-population de MSC-M+ afin de trouver des cibles moléculaires dont l'inhibition pourrait à terme empêcher la croissance tumorale. Ainsi, notre projet de recherche présenté ici, conduit chez l'animal sera dévolu à la mise en évidence *in vivo* du recrutement préférentiel des MSC-M+, de leur devenir dans les tumeurs et du rôle de plusieurs cibles moléculaires dans ces processus. Dans ce projet, nous suivrons la migration des différentes sous-populations de MSC (MSC-M+ et MSC-M-) par microscopie intra-vitale sur un modèle de souris immunodéficientes xénogreffées avec plusieurs types de lignées tumorales humaines.

Pour réaliser ce projet, nous définirons, dans un 1er temps, le nombre de cellules tumorales à implanter dans les chambres dorsales afin de réduire au maximum la cinétique de mise en place d'une tumeur suffisamment grande avec une angiogenèse efficace (mise en place d'une vasculature fonctionnelle) et réduire ainsi le temps d'expérimentation. Dans un 2nd temps, avec le

nombre de cellule optimisé pour chaque lignée tumorale, nous implanterons ces cellules dans des chambres dorsales et nous déterminerons la cinétique d'arrivée des différentes sous-populations de MSC une fois la tumeur installée. Pour terminer, nous déterminerons l'effet de l'inactivation de plusieurs cibles moléculaires sur la migration des MSC-M+ (Procédure 2b).

Ce projet, avec ces différentes étapes, nécessite l'utilisation de 1236 souris.

Le nombre d'animaux utilisés dans le projet est réduit à son minimum pour obtenir dans chaque groupe étudié un nombre d'individus suffisants pour réaliser les tests statistiques et donc obtenir des résultats statistiquement exploitables.

L'ensemble des fondements de la règle des 3R est appliqué dans ce projet :

- Les conditions d'expérimentation font l'objet d'un travail de raffinement continu dans le but d'aboutir à des procédures de travail définies avec une procédure de suivi du bien-être animal adaptées aux expériences. Pendant toute la procédure d'implantation de la chambre dorsale, l'animal est anesthésié et sédaté, et les réflexes et la température de la souris sont contrôlés. L'effet analgésique du mélange étant plus court que l'effet de sédation, de nouvelles injections peuvent être administrées au cours de la chirurgie si l'animal réagit et que le réflexe interdigital est présent. Un antibiotique est appliqué sur les zones de suture. Enfin, pendant la chirurgie et à 24h, un anti-inflammatoire est administré, ce qui permet de contrôler la douleur.

Pour réduire le stress lors du suivi de croissance tumorale, de la mise en place de l'angiogénèse et lors du suivi des MSC, l'animal est anesthésié et installé sur une plaque chauffante tout le temps de l'imagerie. Enfin, l'animal est replacé dans sa cage et est observé jusqu'à son réveil.

- Chaque étude est discutée avec l'ensemble de l'équipe de recherche afin de garantir la pertinence de chaque expérience et d'établir un protocole d'étude adapté à l'obtention de résultats fiables permettant d'atteindre l'objectif. La planification des expériences est organisée de manière à optimiser au maximum les études afin de réduire le nombre d'animaux en évitant la répétition des groupes contrôles indispensable à la validation des résultats mais aussi en multipliant les tests faits à partir des tissus prélevés chez les animaux. La surveillance des souris sera réalisée tous les jours, ceci permettant d'euthanasier les animaux en cas de comportements anormaux ou de souffrance. Les points limites, jugés par le technicien expérimenté, sont : perte de poids rapide (20% en quelques jours), prostration, dos rond, accroissement rapide d'une ou plusieurs masses ou tout autre signe clinique. Les conditions d'hébergement et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute angoisse des animaux. L'utilisation de la fluorescence couplée à l'imagerie non invasive va permettre de suivre dans le temps un même animal. Ceci réduit considérablement le nombre d'animaux nécessaires à l'étude.

11521 La Huntingtine est une protéine nécessaire à la survie des neurones qui, en présence de mutation, est responsable d'une maladie neurodégénérative héréditaire appelée maladie de Huntington. Cette maladie héréditaire est caractérisée par les symptômes suivants : désordres moteurs (chorée), déclin cognitif et troubles psychiatriques entre autres. Ces symptômes, associés à une surmortalité neuronale (neurodégénérescence) apparaissent vers l'âge de 40 ans et les patients meurent habituellement au bout de 15 à 20 ans. En France, plus de 10 000 personnes sont affectées et environ 6 000 personnes développeront la maladie dans les 20 prochaines années. Aujourd'hui, aucun traitement n'est efficace pour prévenir ou retarder la progression de cette maladie.

Précédemment, il a été montré que le clivage de la Huntingtine mutée joue un rôle important dans l'apparition de dysfonctions et de dégénérescence neuronales chez une souris modèle de la maladie de Huntington. De plus, une de nos études précédentes effectuée sur des cultures neuronales *in vitro* prouve que c'est aussi le cas avec la Huntingtine non mutée (saine).

Au-delà de la toxicité amenée par la mutation, l'augmentation du clivage observée chez les patients pourrait empêcher la Huntingtine saine d'exercer ses rôles de neuroprotection. Ainsi, la compréhension de l'importance du clivage Huntingtine saine chez un patient atteint de la maladie de Huntington pourrait aider à développer des stratégies thérapeutiques.

L'injection d'une protéine dans une structure d'intérêt du cerveau constitue une approche unique pour comprendre les conséquences comportementales en fonction de la région atteinte, résultant

à un plus grand clivage de la Huntingtine dans une région très spécifique du cerveau. Ce type d'injection sera réalisé dans des individus sains afin d'évaluer les effets sur la Huntingtine saine puis dans des animaux modèles de la maladie d'Huntington afin d'observer les effets sur les symptômes causés par la Huntingtine mutée.

L'injection de la protéine induisant le clivage de la Huntingtine dans l'ensemble du cerveau sera également réalisée pour permettre de mimer au mieux la maladie à un stade avancé.

La souris apparaît comme le modèle de choix pour ce projet compte-tenu de la similarité de l'organisation anatomo-fonctionnelle de son cerveau avec celle de l'homme et de l'existence chez cette espèce des outils de transgénèse nécessaires. Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude (3 procédures expérimentales) est de 306. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Notamment, des études préliminaires seront effectuées sur des cellules afin de valider le clivage de la Huntingtine par la protéase injectée ou induite.

Ce projet implique de la neurochirurgie et certaines tâches comportementales correspondant à un niveau de douleur de classe modérée. La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance apparaissent.

Le projet traitant du fonctionnement des neurones et nécessitant des approches intégrées et comportementales, il nous est impossible de remplacer le modèle animal vivant par des cultures cellulaires ou des simulations informatiques.

11522 La thérapie à partir de tissus animaux, dévitalisés ou vivants ou de molécules d'origine animale est actuellement utilisée dans certaines indications comme les sérums anti-lymphocytaires (SAL) et constitue un domaine d'avenir comme la xénothérapie.

Un obstacle majeur à cette approche est le rejet ou la réaction de l'organisme humain vis-à-vis de xéno-antigènes animaux. Le projet a pour premier objectif l'élevage (croisements et génotypages) de lignées de lapins n'exprimant pas certains gènes codant pour ces xéno-antigènes. La suppression de l'expression de ces antigènes chez le lapin devrait permettre de réduire les rejets et réactions immunitaires spécifiques et de prévenir certains effets secondaires associés.

Parmi les produits d'origine animale, les sérums anti-lymphocytaires (SAL) sont des immunoglobulines ciblant des cellules immunitaires humaines, les lymphocytes, et sont largement utilisés en thérapeutique humaine pour prévenir de manière efficace les rejets de greffe, la réaction du greffon contre l'hôte en greffe de moelle, et l'anémie aplasique entre-autres. Les SAL sont obtenus en immunisant des animaux contre des lymphocytes humains (cellules essentielles dans l'initiation des rejets). Actuellement, les SAL proposés commercialement sont principalement produits chez le lapin. Nous souhaitons proposer un nouveau SAL préparé chez des lapins n'exprimant pas certains xéno-antigènes et provoquant ainsi moins d'effets secondaires chez les patients traités. Le deuxième objectif de ce projet est donc d'évaluer la réaction immunitaire générée par l'administration de lymphocytes humains à ces lapins.

La production de lapins génétiquement modifiés a déjà été effectuée par la technique de « gene editing ». L'élevage de ces lapins comprend plusieurs étapes : la saillie des lapines, l'élevage des petits après leur naissance, leur identification, l'analyse de leur génotype, la reproduction des animaux de génotype intéressant. Le protocole prévoit d'utiliser au maximum de 100 animaux adultes répartis sur les différentes étapes. Ce nombre a été estimé en considérant que la prolificité des animaux se situe dans la moyenne généralement observée dans les élevages et en considérant les probabilités d'obtention des animaux homozygotes pour le génotype d'intérêt à partir d'animaux hétérozygotes. Dans un souci de la règle des 3R, le nombre d'animaux sera limité, en deçà de cette limite maximale, dès que le génotype d'intérêt sera obtenu. Les anticorps polyclonaux anti-

lymphocytaires ne peuvent être produits que par immunisation d'un animal contre des cellules présentant des épitopes antigéniques variés, ici une lignée cellulaire lymphocytaire T humaine.

Toutes les précautions sont prises pour utiliser les animaux dans des conditions réduisant les stress et souffrances : surveillance des animaux dans l'élevage pour détecter les signes de souffrance ou d'altération de la santé (présence et intervention des vétérinaires sur site), précautions comportementales (les animaux sont isolés -1 animal par cage- après leur sevrage obtenu 7 semaines après la naissance environ), les cages sont grillagées ce qui permet aux animaux d'avoir des contacts visuels, chaque cage est agrémentée d'une mezzanine pour permettre à l'animal de se déplacer dans un plus grand espace, avec des enrichissements pouvant être grignotés, les paramètres de l'environnement (bruit, odeurs, lumière, température, hygrométrie) sont contrôlés et maintenus stables dans le temps.

Cinq protocoles d'immunisation seront évalués tout d'abord chez des lapins Wantanabe (WT). Les 2 protocoles pour lesquels la réponse immunitaire résultante dirigée contre les lymphocytes humains sera la plus forte, seront ensuite évalués et comparés chez les lapins du génotype d'intérêt. Le nombre d'animaux nécessaire pour cet objectif est 55, limité au minimum nécessaire pour avoir une validité des résultats et une analyse statistique (non paramétrique). Plusieurs paramètres seront analysés sur chaque animal afin d'en réduire le nombre. Afin d'évaluer l'innocuité de notre SAL sur les plaquettes humaines, il est nécessaire d'avoir à disposition un contrôle positif : Anticorps anti-plaquettes humaines générés chez le lapin. Pour cela nous immuniserons 3 lapins WT (protocole simple sans utilisation d'adjuvant). En terme de raffinement, les actes légèrement invasifs réalisés sur animaux sont effectués après anesthésie locale afin de diminuer le stress et le risque de souffrance des animaux et une surveillance toute particulière après immunisation sera menée (présence et intervention des vétérinaires sur site). Un nombre total de 158 lapins sera utilisé pour ce projet.

11523 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence fronto-temporale (DFT) sont deux maladies neurodégénératives fatales qui restent actuellement incurables. Le risque de développer ces maladies au cours de la vie est de 1/1000. Des analyses anatomopathologiques ont montré que les patients souffrant de la SLA et de DFT présentent trois types d'inclusions protéiques impliquant les protéines TAU, TDP-43 ou FUS. La protéine FUS est constituée de plusieurs domaines parmi lesquels le domaine NLS pour Nuclear Localization Sequence. Ce domaine est responsable de l'import de la protéine FUS depuis le cytoplasme où elle est synthétisée, vers le noyau. La majorité des patients souffrant de SLA liée à une mutation de FUS présente une mutation dans ce domaine NLS. La protéine FUS est alors retrouvée majoritairement dans le cytoplasme, ce qui n'est pas sa localisation habituelle. Au travers d'approches génétiques, nous aimerions rétablir la localisation cellulaire de la protéine FUS chez des souris adulte présentant une mutation dans le domaine NLS de la protéine FUS (modèle de souris transgéniques déjà bien caractérisée au sein de notre laboratoire (les souris FUS delta NLS). Etant donné les mécanismes étudiés ainsi que leur intégration dans des systèmes anatomiques complexes, il n'est pas possible de remplacer le modèle murin par des modèles *in silico* ou *in vitro*. Nous allons réaliser une étude comportementale longitudinale de ces souris (test d'agrippement pour évaluer la force, le test de la marche pour évaluer la coordination et le suivi du poids). Les souris sont laissées à plusieurs par cage et un enrichissement sera mis à disposition. Les techniques que nous utiliserons pour avancer dans ce projet sont déjà mises au point et utilisées de manière courante dans notre laboratoire et sont donc raffinées. Afin de réduire le stress lié à la manipulation des souris, celles-ci seront préalablement habitués à l'expérimentateur. Dans la perspective du respect de l'approche des 3 R, nous avons de plus réduit le nombre de souris utilisé. Nous proposons d'utiliser un total de 130 souris. Ces souris ne présentent que des problèmes moteurs légers. En accord avec l'échelle d'évaluation de la douleur de Langford (2010), nous chercherons 5 critères que nous évaluerons sur un score allant de 0 à 2 pour chaque critère retenu : 0 correspondant à l'absence de l'expression considérée visible, 1 correspondant à une expression caractérisant une douleur modérée et 2 correspondant à une expression de douleur sévère. Voici les 5 critères évalués : rétrécissement des orbites oculaires (orbital tightening) et yeux mi-clos, renflement du nez (nose bulge), renflement des joues (cheek

bulge), positionnement des oreilles (ear position) vers l'arrière et changement de position des vibrisses (whisker change) qui peuvent être regroupées vers l'arrière ou hérissées en avant. Si les souris présentent des signes de souffrance, nous passerons à un suivi quotidien pour le poids et l'ensemble des autres critères. La compréhension des mécanismes à l'origine de la délocalisation de FUS dont la conséquence est pathologique, pourrait permettre de développer de nouveaux traitements qu'il serait possible de proposer aux patients pour affronter cette maladie jusqu'alors incurable

11524 *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie opportuniste responsable d'infections nosocomiales et de pneumonies, touchant principalement les personnes immunodéprimées. En colonisant de façon chronique les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, *P. aeruginosa* est également responsable en grande partie de la morbidité et de la mortalité associée à cette maladie. L'augmentation actuelle de l'incidence des souches multi résistantes de *P. aeruginosa* (PAMR) est donc particulièrement inquiétante. C'est pourquoi, il est à présent urgent de trouver des solutions thérapeutiques alternatives à l'usage des antibiotiques. Notre objectif est de développer des anticorps thérapeutiques neutralisants dirigés contre un facteur de virulence de la bactérie, à savoir sa porine OprF. Pour ce faire, une banque de 10 millions de scFvs (fragments d'anticorps purifiés) a été constituée. Cette banque a ensuite été testée et 12 scFv ont été sélectionnés. Nous avons sélectionné *in vitro* les 3 scFvs ayant montré une affinité particulièrement élevée pour la cible. Afin de faire la preuve de concept préclinique, l'efficacité thérapeutique de chacun de ces 3 scFvs doit à présent être testée *in vivo*, dans un modèle d'infection à *Pseudomonas*, sur un organisme disposant de défenses immunitaires appropriées ; De même que l'effet de la dose du scFv le plus neutralisant sur le déroulement de l'infection. Ce projet nécessite l'utilisation de 180 souris au total, et a été conçu en respectant la règle des 3 R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Nous avons remplacé au maximum l'utilisation d'animaux par des tests *in vitro* préalables, nous permettant de sélectionner 3 molécules candidates sur 10 millions de molécules initiales. Le nombre d'animaux a été réduit au nombre minimal de souris nécessaire pour obtenir des réponses pertinentes d'un point de vue statistique ainsi que pour satisfaire aux exigences réglementaires précliniques. Nous testerons notamment l'efficacité de ces 3 molécules quant à leur capacité à protéger les animaux d'une infection aiguë. Puis la meilleure molécule sera testée en dose croissante, afin de déterminer la dose minimale et maximale d'efficacité. Pour le raffinement, le bien-être des animaux sera assuré en les hébergeant en groupes au sein d'un environnement enrichi. L'inoculation de la bactérie par voie intranasale se fera sous une légère anesthésie. Après inoculation de la bactérie, toutes les souris bénéficieront d'une étroite surveillance afin de détecter au plus tôt les signes d'une éventuelle souffrance.

11525 Le calcium est un messager cellulaire d'une grande importance et qui est impliqué dans de nombreux processus physiologiques. Notre travail concerne les mécanismes de régulation du calcium et leur importance en hémostasie et dans la relation entre les vaisseaux sanguins et les cellules du sang.

Nous avons observé que l'absence d'une protéine participant au stockage du calcium se traduisait par une diminution de l'activité des plaquettes sanguines, qui sont des cellules circulantes du sang dont la fonction est de détecter la rupture de l'intégrité des vaisseaux sanguins et de former un agrégat pour bloquer la fuite de fluide en cas de lésion.

Dans ces conditions, nous voulons savoir si cette protéine peut aussi avoir un rôle sur le processus inflammatoire. En effet, une étude préliminaire suggère que son absence se traduit par des effets distincts participants à la réaction inflammatoire et semblent indiquer que la régulation de cette protéine puisse diminuer la réaction inflammatoire ce qui pourrait avoir un bénéfice en santé humaine.

Mais comme cette protéine est exprimée dans plusieurs types cellulaires qui sont impliqués dans la réaction inflammatoire, nous déterminerons si les effets observés sont dépendants, ou pas, des plaquettes, des globules blancs ou des cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins. Le recours à des animaux est nécessaire pour ce projet car l'existence d'animaux déficients pour la

protéine permet d'évaluer le rôle de cette protéine dans la réponse inflammatoire et la fonction endothéliale, *in vivo*.

Afin de répondre à la règle des 3 Rs, les animaux sont élevés dans un hébergement agréé, respectant au maximum le bien-être des animaux avec un enrichissement du milieu (morceaux de bois à ronger, filaments de papier kraft pour la nidification), la souffrance sera limitée par le respect des méthodes anesthésiques et analgésique. L'ensemble des expériences seront effectuées par une personne habilitée à expérimenter sur animaux. Enfin le nombre d'animaux nécessaire à l'ensemble de l'étude a été défini pour chaque procédure de façon à avoir une réponse statiquement analysable tout en limitant l'importance par la réalisation de plusieurs procédures en parallèle quand cela est possible.

Ainsi le nombre total de souris prévus est de 538.

11526 De nombreuses études chez l'homme et chez les rongeurs suggèrent que l'activité physique améliorerait les symptômes de certaines pathologies telles que l'obésité (DIO), le diabète de type 2 (T2D) ou l'accident vasculaire cérébral (AVC). L'AVC, qui est provoqué par un manque d'apport en oxygène au niveau du cerveau (ischémie), est une complication majeure du diabète et de l'obésité augmentant considérablement la morbidité et la mortalité des patients. Malgré les efforts intensifs des équipes de recherche à valider un médicament anti-ischémique efficace, l'option thérapeutique est extrêmement limitée et l'AVC reste la deuxième cause de décès dans le monde. Ainsi la prise en charge de facteurs de risque et la compréhension des mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques de l'exercice physique apparaît donc aujourd'hui comme des priorités pour réduire l'incidence de certaines pathologies comme l'AVC.

Certains de nos résultats préliminaires suggèrent que l'exercice physique volontaire augmente 1/ chez le rongeur, le niveau circulant d'une molécule nommée PE et 2/ chez l'homme, la quantité de la protéine à l'origine du PE dans le muscle. Le PE est une petite molécule générée par la maturation de la protéine sortiline. Des études menées dans notre laboratoire suggèrent que ce propeptide est impliqué à la fois dans la protection des cellules bêta du pancréas et dans celle des cellules neuronales. Au niveau périphérique le PE a de puissants effets antidiabétiques en contrôlant la sécrétion d'insuline par les cellules bêta pancréatiques et, au niveau central, il stimule la production de nouveaux neurones et de synapses. De plus, il a été montré *in vivo* que les peptides dérivés de la sortiline possédaient de puissants effets anti-dépresseurs. Cette molécule apparaît donc particulièrement intéressante car elle est naturellement produite par l'organisme et présente des effets bénéfiques à la fois sur les désordres métaboliques et les problèmes centraux associés. A ce jour cependant, aucune étude publiée ne fait état de son mode de régulation *in vivo*. Le PE pourrait pourtant être un élément essentiel des effets bénéfiques de l'exercice, ouvrant de nouvelles perspectives scientifiques et thérapeutiques dans les domaines du DIO, du T2D et de l'AVC.

Nous souhaitons par ce projet apporter des informations préliminaires indispensables dans ce domaine en :

1/ précisant le mode de production de PE par l'exercice. Pour cela, des souris C56Bl6 seront soumises à un exercice volontaire ou standardisé pour réaliser des prélèvements de sang et d'organes à différents stades de l'exercice ;

2/ élaborant un protocole de déplétion du PE produit pour en étudier ultérieurement les effets physiologiques. Pour cela nous utiliserons des anticorps dirigés spécifiquement contre ce propeptide. Différentes doses et différentes stratégies d'injection (intraveineuse, intrapéritonéale et infusion par pompe osmotique) de cet anticorps seront testées. Une démarche par étapes successives et dépendantes les unes des autres seront utilisée pour réduire au mieux le nombre de souris nécessaire.

L'ensemble de ce projet utilise principalement des procédures simples d'exercice et d'injection qui n'affecteront que faiblement la qualité de vie des animaux. Ce projet a été élaboré et sera réalisé dans le respect des 3R car 1/ le nombre minimum d'animaux nécessaires sera utilisé tout en conservant la pertinence des données statistiques (soit 810 souris au maximum) (réduire), 2/ l'efficacité de l'anticorps utilisé pour diminuer la quantité de PE libre circulant a été testée au

préalable *in vitro* (remplacer) et 3/ les animaux seront hébergés dans des locaux appropriés avec les enrichissements requis et des méthodes d'anesthésie et d'analgésie adaptées seront utilisées (raffiner). Les souris seront suivies quotidiennement via une grille de score qui définit des points limites précoces et adaptés. L'atteinte d'un point limite entrainera l'arrêt immédiat de la procédure pour l'animal concerné.

Grâce à ce projet nous préciserons les conditions d'exercice conduisant à une augmentation du propeptide dans le sang et vérifierons que cette production peut avoir des effets physiologiques (déplétion du PE circulant et test de comportement). Cette étape est essentielle avant la mise en place d'un projet plus large concernant le rôle spécifique du PE dans les effets bénéfiques de l'exercice sur l'obésité, le diabète et l'AVC qui pourrait ouvrir la porte à de nouvelles opportunités thérapeutiques.

11527 Le projet d'expérimentation animale présenté dans ce dossier vise à étudier l'impact d'une mutation des gènes codant pour les récepteurs aux hormones corticostéroïdes (récepteur glucocorticoïde - GR- et récepteur minéralocorticoïde -MR-) sur la réponse au stress du zebrafish. Pour cela, nous produiront des lignées transgéniques dans lesquels les gènes GR et MR auront été mutés, ces mutations entraînant une inactivation des récepteurs. Des lignées de zebrafish porteur d'une mutation MR et/ou GR seront donc comparées à une ligne sauvage (non mutée) : Chez ces poissons, nous étudierons la réponse de l'axe corticotrope après application soit d'un stress aigu (pêche + confinement) soit d'un stress chronique (divers protocoles de stress appliqués de manière aléatoire durant 12 jours). Nous mesurerons la réponse cortisol ainsi que l'expression de différents gènes clés du fonctionnement de l'axe corticotrope. Ce phénotypage sera réalisé sur des individus adultes mâles ou femelles. Dans ce projet nous utiliserons 880 zebrafish.

Le projet proposé prend en compte la règle éthique des 3Rs :

- Remplacer : il n'existe pas d'alternative à ces expérimentations car nous ne disposons pas de lignées cellulaires ou de culture d'explants des tissus constituant l'axe corticotrope (cerveau, hypophyse, interrénale) pour remplacer l'utilisation d'animaux vivants.

- Réduction : Le nombre d'animaux qui seront utilisés dans ces expérimentations est adapté à l'étude réalisée (n= 8 poissons par jour, par génotype et par traitement) : ce nombre a été établi sur la base de travaux similaires réalisés chez la truite et montrant que de tels effectifs (n=8) sont adaptés aux différences que nous recherchons (variation de niveau de l'ordre du simple au double).

- Raffiner : Les mutations des gènes GR et MR ne devraient pas être létales ni engendrer de la douleur chez les zebrafish mutés. Ceci est attesté par des travaux similaires déjà publiés chez le zebrafish ou le medaka en eau douce. Malgré cela, le protocole expérimental proposé préconise l'euthanasie prématurée des larves ou autres stades en cas de malformation, comportement anormal ou problèmes de santé incompatibles avec la survie à long terme des poissons.

11528 Le glioblastome est la tumeur cérébrale primitive la plus fréquente et la plus agressive de l'adulte. Sur le plan biologique, cette tumeur se caractérise par une importante vascularisation et une forte expression du VEGFA. Actuellement, le traitement de première ligne repose sur l'association radiothérapie et chimiothérapie par témozolomide. La récurrence reste inévitable dans un délai médian de 7 à 9 mois et peu d'options thérapeutiques sont alors disponibles. Récemment, le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGFA a permis l'obtention de taux de réponse très intéressants, de 30% à 50%, chez des patients porteurs de glioblastome à la récurrence. Néanmoins, si l'utilisation de bevacizumab est associée à une augmentation significative de la survie sans progression et de la qualité de vie des patients, aucun bénéfice en survie globale n'a pu être identifié en première ligne thérapeutique ou à la récurrence. Ces résultats soulignent la nécessité d'identifier un biomarqueur capable de prédire l'activité de cette molécule. Nous avons récemment identifié deux métalloprotéases (MMP) comme potentiels biomarqueurs prédictifs. En effet un taux plasmatique initialement élevé de MMP2 ainsi qu'un taux initialement faible de MMP9 étaient significativement corrélés à la réponse, à la survie sans progression et à la survie globale de patients porteurs d'un glioblastome récidivant. A l'heure actuelle, le mécanisme biologique de leur implication dans la réponse aux agents anti-angiogéniques est hypothétique, mais sa compréhension reste

indispensable à leur utilisation en pratique clinique. Un modèle animal intégré est nécessaire pour appréhender le fonctionnement global. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale dans ce domaine.

Nous validerons l'intérêt de ces deux marqueurs dans un système intégré (modèle murin) afin d'appréhender de façon globale leur rôle dans la vascularisation mais aussi leur rôle de biomarqueur. Nous travaillerons avec deux lignées de glioblastomes dont une lignée de cellules souches. Quatre traitements seront testés pour chaque lignée avec un total de 21 souris par traitement, soit un total de 168 souris pour l'étude globale.

L'équipe utilise des lignées cellulaires exprimant l'IRFP afin d'analyser la croissance tumorale des glioblastomes sur animal endormi, cette technique nous permettra un suivi continu en imagerie de chaque animal grâce à un appareil dédié à l'imagerie du proche infrarouge. Cette technique nous permet de réduire le nombre d'animaux à utiliser pour chaque condition testée. De plus, conformément à la législation, le Raffinement sera mis en place : l'enrichissement des cages sera réalisé avec l'ajout de nids. Le protocole de prise en charge de la douleur pendant toute la durée de l'expérience est proposé, ainsi : les souris seront anesthésiées et des injections d'anesthésique locales en sous-cutanée permettront de compléter l'anesthésie sur le site d'incision et aux points de pression de l'appareil stéréotaxique. Une surveillance anesthésique continue sera effectuée : couleur des muqueuses, fréquence respiratoire, type de respiration, réflexes, réponse à un stimulus douloureux. Une lampe chauffante sera mise en place pour éviter l'hypothermie durant l'anesthésie des animaux. Un tapis chauffant sera utilisé lors de la chirurgie. Dès que l'animal sera inconscient, un onguent ophtalmique sera appliqué sur les yeux afin d'éviter l'assèchement de ceux-ci. Enfin les points limites sont définis par avance et valider un comité éthique.

11529 Le choc septique est une infection grave ayant un retentissement sur l'ensemble de l'organisme et mettant en jeu le pronostic vital avec un taux de mortalité élevé. L'amélioration de sa prise en charge est un enjeu majeur. Les mécanismes de la progression d'une infection localisée, parfois banale, au choc septique puis au décès restent mal connus. Le choc septique est caractérisé par une défaillance cardiocirculatoire avec une hypotension artérielle, ne répondant pas au remplissage vasculaire et nécessitant un traitement par amines vaso-actives. La contractilité cardiaque peut être altérée, aggravant la défaillance circulatoire. Il existe une différence de réponse au sepsis en fonction du sexe, avec un effet protecteur du sexe féminin sur la mortalité. De récentes études suggèrent que cette différence serait associée à un effet protecteur du sexe féminin sur la fonction myocardique. La compréhension des mécanismes protecteurs chez les individus de sexe féminin pourrait ouvrir la voie vers de nouvelles possibilités de prise en charge thérapeutiques. L'hyperstimulation du système adrénergique joue probablement un rôle important dans cette dysfonction myocardique. Le blocage des récepteurs bêta1-adrénergique par bêta1-bloquants est un traitement prometteur pour prévenir cette cardiopathie liée au sepsis. L'intérêt d'un traitement par bêta-bloquant pour améliorer la fonction cardiaque au cours du sepsis a été récemment démontré chez des rats mâles. L'objectif principal de notre étude est de mettre en évidence le rôle des hormones sexuelles féminines dans la dysfonction myocardique liée au sepsis. Les objectifs secondaires sont d'évaluer l'intérêt d'un traitement par bêta1-bloquants dans la prévention de cette dysfonction myocardique chez les rats femelles en fonction du statut hormonal et d'évaluer le rôle des hormones sexuelles féminines dans la réponse inflammatoire au sepsis. Le rôle des hormones sexuelles féminine sera évalué par réalisation d'une castration chirurgicale par ovariectomie bilatérale chez les rats femelles, afin d'obtenir deux groupes : un groupe de femelles castrées et un groupe contrôle. La fonction cardiaque sera évaluée en utilisant l'imagerie par Résonance Magnétique (IRM), permettant ainsi une analyse dans les conditions réelles. La réponse inflammatoire sera évaluée par quantification de l'œdème pulmonaire par IRM et sur poumons explantés. Grâce à cette étude, nous espérons mettre en évidence un rôle protecteur des hormones sexuelles féminines dans la dysfonction myocardique liée au sepsis et ouvrir la voie à de nouvelles possibilités thérapeutiques. Nous espérons également montrer un bénéfice à l'utilisation d'un bêta-bloquant pour améliorer la fonction cardiaque au cours des infections graves chez les femelles ovariectomisées. La contractilité cardiaque des rats femelles ovariectomisées traités par bêta1-

bloquants serait mieux préservée par rapport au groupe contrôle. Le but à long terme est de pouvoir utiliser ce traitement chez l'Homme pour améliorer la prise en charge des patients et donc leur devenir. Une meilleure identification de la population cible à l'utilisation de ce traitement prometteur, notamment les femmes ménopausées, est primordial à l'ère de la médecine personnalisée. Les dommages prévisibles pour les animaux sont la castration chirurgicale par ovariectomie bilatérale et l'induction d'un sepsis dont l'évolution naturelle est la défaillance multiviscérale puis le décès des rats en quelques jours. L'euthanasie des rats à la 24ème heure dans les conditions réglementaires évite la souffrance et la douleur engendrée par cette évolution naturelle. Notre approche expérimentale respecte la règle des 3R : Notre analyse statistique préliminaire montre que le nombre de sujets nécessaires pour mettre en évidence une différence est de 8 animaux par groupe soit 48 sujets au total. L'espèce choisie est le rat car elle possède des caractéristiques hémodynamiques et métaboliques proches de l'Homme durant le choc septique. Le modèle animal permet une étude des paramètres cardiaques *in vivo*, essentielle pour prendre en compte les modifications hémodynamiques et vasculaires susceptibles d'influencer cette fonction lors du sepsis. Notre approche expérimentale permet de tester plusieurs hypothèses à la fois, à savoir le rôle des hormones sexuelles féminines dans la dysfonction myocardique liée au sepsis ainsi que la réponse à un traitement bêta1-bloquant en fonction du statut hormonal, et permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Des dosages sanguins de différentes cytokines pro inflammatoires et la quantification de l'œdème pulmonaire par IRM permettront également de caractériser les mécanismes d'action des hormones sexuelles et des bêta-bloquants chez ces mêmes animaux. Une période d'acclimatation de 7 jours sera respectée avant la 1ère procédure expérimentale. Les conditions d'hébergement visent à leur apporter le maximum de bien-être et à satisfaire leurs besoins physiologiques. Les animaux seront hébergés socialement dans des armoires ventilées (contrôlées pour température et hygrométrie) en cycle jour/nuit de 12h. L'environnement des cages sera enrichi avec du matériel de cache (tunnels, arches), de nidification (cellulose, papier craft) et à ronger (buchettes de bois, briquettes de foin). Les animaux seront inspectés quotidiennement et les litières changées au minimum 2 fois par semaine. Une personne est chargée du bien-être des animaux. La douleur est limitée par une anesthésie inhalée associée à un morphinique pour les actes douloureux (ovariectomie bilatérale, cathéter veineux, ligature-ponction caecale). Après réalisation de la procédure d'ovariectomie bilatérale, un suivi des animaux est réalisé tous les jours à l'aide d'une grille d'évaluation de la douleur, prenant en compte les modifications de poids, l'apparence physique, l'examen clinique, le comportement et la réponse aux stimuli de l'animal. En fonction du score total obtenu, un point d'arrêt anticipé peut être décidé. Le même suivi est effectué après induction du sepsis. L'angoisse liée à la réalisation de l'IRM est limitée par une anesthésie inhalée. La température corporelle sera maintenue à 37°C pendant l'examen grâce à une couverture chauffante. L'euthanasie à la 24ème heure se fera sous barbituriques. Ceci permet également de limiter les souffrances engendrées par l'évolution du sepsis.

11530 Du fait du fort nombre de cas de cancers et d'une mortalité associée encore élevée, l'oncologie représente un enjeu scientifique et clinique très important. Le développement préclinique de nouveaux candidats médicaments repose sur l'utilisation de modèles cellulaires prédictifs permettant de sélectionner et d'optimiser des composés. Ces composés ainsi sélectionnés doivent ensuite être évalués en terme d'efficacité sur des modèles animaux relevant. Les tumeurs sont des ensembles cellulaires complexes et intégrés faisant intervenir la cellule tumorale, son micro-environnement mais aussi d'autres grandes fonctions tel que le système immunitaire, le système nerveux central, le système vasculaire, etc., c'est pourquoi l'utilisation de modèles animaux est justifiée et ne peut être substituée par de l'expérimentation *in vitro*.

Dans ce sens, nous proposons la réalisation de modèles expérimentaux basés sur l'implantation sous-cutanées de cellules tumorales chez la souris de même fond génétique. Dans le cas particulier d'étude sur des cellules tumorales humaines, l'utilisation de souris immunodéficientes est nécessaire. Les modèles proposés sont bien décrits dans la littérature et font figure de référence. Ainsi, ces différents modèles animaux nous permettent d'évaluer de nouvelles approches thérapeutiques visant notamment à stimuler l'activité du système immunitaire permettant de freiner la progression tumorale voire d'éliminer la tumeur. Ces approches sont principalement basées sur

i) l'utilisation de modulateurs (petites molécules ou anticorps thérapeutiques) de verrous immunologiques impliqués dans l'échappement immunitaire tumoral, et/ou sur ii) l'utilisation de virus oncolytiques.

Ces expériences seront réalisées dans les meilleures conditions en respectant les règles de bioéthiques (grâce à l'utilisation d'analgésie, au recours à l'anesthésie), des 3R (Remplacer, réduire, Raffiner) et conformément à la législation en vigueur. A ces fins, les composés testés auront été préalablement testés *in vitro*, afin de déterminer les doses à utiliser, de s'affranchir de la toxicité des composés et de limiter le nombre d'animaux. Les groupes sont de 20 animaux pour obtenir des tests statistiques robustes, évitant ainsi de réitérer une étude. Les animaux sont hébergés dans des conditions veillant au respect de leur bien-être (en fratrie) et avec un milieu enrichi (jouet) afin de limiter leur stress. Les animaux sont suivis quotidiennement afin de détecter tout inconfort ou souffrance. Une étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et notre équipe d'expérimentateurs permet d'intervenir immédiatement sur les animaux en cas de nécessité (points limites). Un nombre de 20 études par an – 7 groupes expérimentaux moyens de 20 animaux par groupe ; ie. 140 animaux au total (au maximum) par étude (14000 souris sur 5 ans) – sera réalisé.

11531 De nombreuses situations pathologiques mènent à une perte de muscle importante. Cette perte de muscle se caractérise par une perte de masse, un changement de structure et des modifications métaboliques ayant pour conséquences une perte d'autonomie, des retards de récupération, et à terme des coûts de prise en charge élevés. Notre objectif répond à un enjeu majeur de santé publique : Développer des stratégies d'intervention pour préserver la masse musculaire et améliorer la récupération musculaire, notamment lors des périodes d'inactivité physique (immobilisation, alitement) qui sont fréquemment associées aux situations cataboliques.

Le métabolisme protéique intestinal et musculaire sont intimement liés. Nos données préliminaires suggèrent fortement que la priorité doit être donnée à l'intestin pour permettre une récupération optimale au niveau musculaire. En d'autres termes, le muscle squelettique ne peut initier sa récupération de façon efficace que si l'intestin a déjà récupéré. Nous avons montré que l'administration d'une hormone gastro-intestinale en amont d'un jeûne avait permis non seulement de préserver l'intestin, mais également d'accélérer la récupération intestinale et musculaire au moment de la renutrition. Cependant, les événements de la vie ne sont pas tous prédictibles. L'intérêt de l'utilisation de cette hormone gastrointestinale serait donc d'autant plus important si son effet bénéfique existe également lorsqu'administré une fois la situation catabolique déclarée et s'il peut être étendu à d'autres situations cataboliques, et notamment l'inactivité physique.

Nos objectifs sont donc de déterminer l'impact de l'administration du GLP2 1) sur la fonte musculaire pendant l'immobilisation et 2) sur la récupération musculaire pendant la remobilisation.

La fonction musculaire sera évaluée par la mesure de la masse et du métabolisme protéique musculaire, ainsi que les paramètres qui le contrôlent. Nous mesurerons les taux circulants en acides aminés pour évaluer leur utilisation par les viscères et leur disponibilité pour les muscles.

Nous estimons que 760 souris au maximum seront nécessaires pour mener à bien cette étude sur 5 ans. Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) en accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE seront les suivantes :

- « Remplacer » : Nous étudions les effets de différents niveaux de contraintes environnementales sur la physiologie du système musculaire. Les expérimentations animales avec système intégré sont donc primordiales. Des modifications au niveau de l'organisme entier, telles que les adaptations intestinales, peuvent influencer la cinétique de perte musculaire. Nous avons choisi la souris comme modèle animal car les processus d'adaptation métabolique au niveau musculaire lors de situations cataboliques sont proches de celles de l'homme. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

- « Réduire » : Nous avons prévu le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux différentes questions scientifiques, garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et palier l'exclusion de certaines souris dans l'expérimentation. Ce nombre d'animaux maximal sera

revu à la baisse quand les résultats obtenus ne nécessiteront pas de répétitions pour valider les observations.

- « Raffiner » : Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. i) les animaux seront adaptés à leur environnement avant les expérimentations. ii) un suivi quotidien (poids corporel, prise alimentaire) des animaux sera réalisé 2 fois par jour pendant l'immobilisation et/ou l'administration de l'hormone. iii) Des points limites ont été définis pour identifier rapidement tout signe de souffrance éventuel (comportement des souris : agressivité / apathie), de réduction de prise alimentaire trop importante (>15% de l'ingéré spontané avant expérimentation), ou perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial). Dans ce cas, l'animal sera retiré des procédures expérimentales et euthanasié si les signes persistent dans les 24h. Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi pour améliorer les conditions d'hébergement.

11532 Aujourd'hui, les différences concernant le devenir des médicaments dans l'organisme selon le genre, hommes ou femmes, sont encore mal connues. Les études de pharmacocinétique sont très majoritairement menées chez les hommes, si bien qu'il est difficile d'anticiper ou d'adapter les doses de médicaments chez les femmes.

Chez les femmes, la grossesse ajoute de nouvelles spécificités à la pharmacocinétique qui compliquent la prise en charge médicamenteuse des femmes enceintes. De plus, la prise de médicaments chez la femme enceinte induit un risque d'exposition fœtal dont il faut impérativement mesurer l'importance et les conséquences pour le déroulement de la grossesse et le développement de l'enfant.

La prise en charge de maladies chroniques telles que le diabète, le cancer, les maladies infectieuses ou les pathologies neuropsychiatriques comme l'addiction pourrait être améliorée par une meilleure connaissance des paramètres qui conditionnent le devenir du médicament dans l'organisme : la pharmacocinétique. Cela permettrait notamment d'adapter les doses et les modalités de prise des médicaments afin d'en améliorer la tolérance et l'efficacité, dans un objectif de médecine personnalisée. Il est donc important d'identifier les singularités qui pourraient expliquer des différences pharmacocinétiques entre les hommes et les femmes. Chez les femmes, la grossesse s'accompagne souvent de modifications de la pharmacocinétique des médicaments dont les mécanismes ne sont pas toujours bien compris.

Aujourd'hui, la pharmacocinétique clinique repose sur la mesure de la concentration des médicaments dans le sang. Pourtant, c'est bien souvent au niveau des organes et des tissus que s'exerce l'effet pharmacologique des médicaments. Les tissus sont souvent séparés du compartiment sanguin par des barrières biologiques dont le franchissement par les différentes molécules est difficile à prédire et à mesurer. C'est notamment le cas pour la barrière fœto-placentaire, dont le franchissement par des médicaments pourrait entraîner des effets pharmacologiques ou toxiques chez le fœtus.

L'objectif principal de cette étude est i) de mettre en évidence des différences de distribution tissulaire des médicaments entre mâles et femelles, et ii) d'estimer l'exposition tissulaire et fœtale par le médicament étudié lors d'une administration chez la mère. Les médicaments testés correspondent à des pathologies fréquentes chez la femme enceinte pour lesquels on manque d'informations concernant leur pharmacocinétique pendant la grossesse. Ce travail permettra d'identifier de nouveaux paramètres physiologiques qui pourraient expliquer certaines spécificités de la pharmacocinétique des médicaments liés au sexe ou à la grossesse.

Pour ce projet, nous utiliserons des primates non-humains : du point de vue physiologique, la gestation, la structure placentaire et les échanges materno-fœtaux sont très proches de ceux que l'on retrouve chez la femme.

Ce projet s'appuie sur des études préalables menées *in vitro* et chez le rongeur. Le recours au PNH est nécessaire du fait des différences notables sur le passage des barrières biologiques, notamment placentaire, ne permettant pas une extrapolation entre les rongeurs et les primates 2. Le nombre d'animaux de 12 (6 mâles et 6 femelles) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des

données statistiquement significatives. Les animaux seront nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Tous les animaux seront hébergés par paire ou en groupe, et les femelles après mise bas resteront avec leurs nouveau-nés dans leur groupe. L'étude est réalisée sur des mâles et des femelles (gestantes puis hors gestation).

La mise en œuvre de méthodes non invasives de suivi au cours du temps (techniques d'imagerie utilisées en médecine humaine) permet de réduire le nombre d'animaux. La biodistribution des médicaments sera estimée par imagerie utilisant un analogue radiomarqué du médicament, dans différents organes chez le mâle, la femelle au cours et hors période de gestation.

Les méthodes expérimentales ont été choisies de façon à éviter toute souffrance lors des interventions (imagerie et prélèvement sanguin), les manipulations des animaux se feront sous anesthésie générale. Des critères d'arrêt sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus, ce qui permettra d'intervenir immédiatement, avec un recours au vétérinaire afin de mettre en œuvre les traitements appropriés.

11533 De nombreuses situations pathologiques (situations cataboliques) mènent à une perte de muscle importante. Cette perte de muscle se caractérise par une perte de masse, un changement de structure et des modifications métaboliques, le tout ayant pour conséquences une perte d'autonomie, des retards de récupération, et à terme des coûts de prise en charge élevés. Notre objectif répond à un enjeu majeur de santé publique : Développer des stratégies d'intervention pour préserver la masse musculaire et améliorer la récupération musculaire. L'état des réserves énergétiques intramusculaires ainsi que leur mobilisation sont des points clés pour une meilleure adaptation du muscle squelettique lors des situations cataboliques et conditionne la résistance à la perte de muscle. Nous avons précédemment montré que l'utilisation d'un régime alimentaire enrichi en DHA permettait d'augmenter les réserves énergétiques mobilisables et de prévenir la fonte musculaire. Il est maintenant nécessaire d'identifier les mécanismes à l'origine de cet effet bénéfique du DHA qui restent inconnus à l'heure actuelle.

Nos objectifs spécifiques sont donc d'étudier les mécanismes 1) à l'origine de l'augmentation des réserves énergétiques intramusculaires en réponse à un régime enrichi en DHA et 2) à l'utilisation de ces réserves chez la souris dans un modèle qui reproduit une situation catabolique avec une perte de masse musculaire associée, le jeûne.

La composition corporelle et l'activité spontanée des souris seront évaluées pendant le protocole expérimental. Nous évaluerons les paramètres qui contrôlent la masse et la fonction musculaire, i.e. le métabolisme protéique musculaire, les réserves énergétiques intramusculaires, et les paramètres de l'homéostasie mitochondriale...

Nous estimons que 960 animaux au maximum seront nécessaires pour mener à bien cette étude sur 5 ans. Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) en accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE seront les suivantes :

- Remplacer : Nous étudions les effets de différents niveaux de contraintes environnementales sur la physiologie du système musculaire. Les expérimentations animales avec système intégré sont donc primordiales. Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier peuvent influencer la cinétique de perte musculaire. Nous avons choisi la souris comme modèle animal car il permet de mettre en place des modèles d'étude pertinents pour la physiologie musculaire et de par l'intérêt des modèles transgéniques disponibles. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

- Réduire : Nous avons prévu le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux différentes questions scientifiques, garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et palier l'exclusion de certaines souris dans l'expérimentation. Ce nombre d'animaux maximal sera revu à la baisse quand les résultats obtenus ne nécessiteront pas de répétitions pour valider les observations.

- Raffiner : Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. i) Les animaux seront adaptés à leur environnement avant l'expérimentation. ii) Un suivi (poids corporel, prise alimentaire) des animaux,

hebdomadaire (pendant la période de mise sous régime alimentaire enrichi en DHA) et quotidien (pendant le jeûne et la renutrition), sera réalisé. iii) Des points limites ont été définis pour identifier rapidement tout signe de souffrance éventuel ou perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial). Dans ce cas, l'animal sera retiré des procédures expérimentales et euthanasié si les signes persistent dans les 24h. Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi pour améliorer les conditions d'hébergement.

11534 Actuellement, le suivi et la maîtrise de la reproduction des juments nécessitent des interventions invasives. En effet, pour vérifier si une jument a repris les cycles de reproduction après le repos sexuel hivernal, ou pour vérifier si elle est gestante après une insémination, les éleveurs demandent au vétérinaire de réaliser une prise de sang pour un dosage de progestérone. De plus, pour induire l'ovulation d'une jument afin de l'inséminer au plus près de l'ovulation et ainsi maximiser les taux de réussite, les éleveurs peuvent demander au vétérinaire une injection d'hormones.

Ces interventions invasives, prise de sang ou injection, pourraient être remplacées par des dosages d'hormones dans la salive, pour analyser le taux de progestérone ou identifier un marqueur prédictif de l'ovulation. En effet, le prélèvement de salive chez la jument est facile, non invasif, non douloureux et peut-être réalisé par l'éleveur lui-même. De plus, dans une étude antérieure, nous avons montré qu'il était possible de doser dans la salive porcine les hormones stéroïdiennes qui sont impliquées dans la reproduction, et notamment la progestérone.

Notre objectif est de vérifier qu'il est possible de doser les hormones stéroïdiennes dans la salive équine. Pour cela, nous collecterons de la salive et du sang à différents stades du cycle et nous comparerons les concentrations des hormones stéroïdiennes dans la salive et dans le sang. Nous pourrions ainsi vérifier si les dosages sanguins actuels peuvent être remplacés par des dosages salivaires non-invasifs.

Nous réaliserons 8 prélèvements de sang et de salive sur 10 juments : un prélèvement en période de repos sexuel hivernal, cinq prélèvements dans les jours précédents l'ovulation en période de reproduction, un prélèvement 7 à 8 jours après l'ovulation, un prélèvement pendant la gestation 18 jours après ovulation et insémination.

Ces expérimentations comprennent une procédure concernant les prélèvements sanguins dans la veine jugulaire (au niveau du cou).

Remplacement : les concentrations hormonales dans le sang et la salive ne peuvent pas être étudiés *in vitro* et nécessitent des prélèvements sur animaux.

Réduction : Nos travaux antérieurs sur l'espèce porcine ont montré que 10 animaux étaient suffisants pour obtenir des résultats fiables et pour observer des différences significatives des concentrations entre les différents stades.

Raffinement : Les juments sont hébergées en groupes stables, avec accès quotidien à des pâtures extérieures munies d'abreuvoirs. Elles font l'objet d'une surveillance quotidienne. Les prélèvements sanguins sont réalisés par des opérateurs expérimentés (les animaliers auxquels les juments sont habituées) et le volume de sang prélevé est très faible (5ml).

11535 La paroi musculaire de l'abdomen peut être sujette à des faiblesses qui vont permettre l'apparition de tuméfactions : les hernies, dont certaines, comme les hernies inguinales, sont des pathologies très fréquentes en chirurgie générale et ont un impact socioéconomique important.

Près d'un homme sur quatre sera atteint d'une hernie inguinale au cours de sa vie (moins de 3% des femmes) et sera affecté pendant sa période de vie active avec besoin de soins et de repos postopératoire suite à une réparation chirurgicale.

Les stratégies thérapeutiques actuelles visent à privilégier les techniques qui permettent de réduire la convalescence, d'obtenir un confort postopératoire maximal, un taux de récurrences ou de complications faible ainsi que des coûts acceptables.

L'histoire de la chirurgie de la paroi abdominale, en particulier de la hernie inguinale, a ainsi commencé avec des réparations par laparotomie, et diverses techniques anatomiques ont été

développées. Aucune technique n'a prédominé sur une autre, toutes ont obtenu des résultats corrects.

Puis, l'émergence des techniques utilisant des prothèses a permis de réduire le taux de récurrence.

À ce stade de l'histoire, l'évolution des techniques chirurgicales a donné lieu à un grand développement de différents types de matériaux prothétiques. Des matériaux non résorbables qui ont généré une fibrose locale sont apparus. Puis des matériaux biodégradables, compatibles avec le contact direct avec les viscères, ont été développés, dont l'intention était d'éviter les complications, notamment les fistules digestives, secondaires à un contact prolongé entre le matériel prothétique et un segment intestinal. Ces matériaux ont ensuite été mis en place par une approche mini-invasive.

Actuellement, les différentes techniques laparoscopiques, par voie transabdomino-pré-péritonéale (TAPP) et par voie totalement extrapéritonéale (TEP) sont pratiquées dans certains centres chirurgicaux de pointe, avec des résultats sensiblement supérieurs aux techniques « ouvertes », en termes de récupération postopératoire et de qualité de vie.

Néanmoins, la diffusion de cette approche chirurgicale reste encore limitée, et il y a encore une place pour l'innovation, en termes de matériaux et de modalités d'interventions.

L'idée de ce projet est de développer une technique de réparation mini-invasive guidée par l'image qui permettrait l'injection percutanée d'un matériau semblable à un gel liquide qui se solidifie rapidement après son application et assurerait un renforcement/une réparation de la paroi abdominale. Nous souhaitons ainsi tester une nouvelle formulation d'hydrogel qui se solidifie dans les 15 minutes.

L'objectif de cette étude est d'évaluer sur modèle animal l'innocuité et la performance de ce nouvel hydrogel, en comparaison avec des matériaux déjà utilisés comme les prothèses synthétiques, en mesurant les variables suivantes : infection, réaction inflammatoire, fibrose et résistance mécanique.

Le projet sera conduit sur un maximum de 80 rats sur la durée du projet (3 ans), dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : après des études préalables *in vitro*, il reste nécessaire et obligatoire de tester l'innocuité et l'efficacité de produits à usage médical sur des animaux avant de les utiliser chez l'homme. Ceci a pour but de détecter d'éventuelles complications, évaluer la biocompatibilité de l'hydrogel, la durée des procédures, la sécurité et l'efficacité des approches percutanées.

Réduction : le nombre d'animaux utilisés par groupe a été réduit à 10 rats/ groupe pour obtenir des résultats statistiquement significatifs pour chaque dose testée et chaque temps de suivi des effets. 4 doses croissantes seront testées et, selon les résultats obtenus, des expériences pourront être renouvelées à des doses intermédiaires.

Raffinement : toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale et avec contrôle de la douleur pendant et après l'intervention. La température corporelle des animaux sera maintenue tout au long de la procédure au moyen d'un tapis chauffant thermostaté. Les animaux seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié, une grille d'observation des signes cliniques est mise en place afin d'évaluer un mal-être éventuel et de définir des points limites. Le responsable du projet, en concertation avec le vétérinaire désigné, mettra fin à l'expérience en cas d'atteinte des points limites. Les animaux seront maintenus en groupe social à 5/cage contenant de la frisure et des bâtons à ronger.

11536 Le cancer représente la deuxième cause de mortalité dans les pays développés. En dépit de l'amélioration constante de la prise en charge des patients, de nombreux progrès restent à faire et de nombreux travaux sont actuellement menés afin de mettre sur le marché de nouveaux traitements thérapeutiques anti-tumoraux.

Tout nouveau traitement entrant en essai clinique chez l'Homme, doit au préalable avoir démontré son efficacité thérapeutique potentielle lors d'études précliniques.

Cette preuve de concept expérimentale permet de mettre en place un rationnel scientifique solide et nécessite des preuves de concept *in vitro* mais également *in vivo*.

Notre expertise permet aux développeurs de médicaments afin d'avoir accès à des modèles innovants de cancers permettant d'obtenir des données fiables et reproductibles en complément des données générées en interne ou obtenues sur d'autres modèles précliniques.

L'objectif de ce projet est de déterminer *in vivo* les propriétés anti-tumorales de traitements innovants (petite molécule et/ou biothérapie) afin d'identifier ceux potentiellement efficaces en clinique. L'évaluation de ces traitements innovants permettra de définir leur efficacité anti-tumorale ainsi que les informations nécessaires pour choisir leur posologie en vue de leur utilisation future en clinique.

Ce projet se base sur l'utilisation de modèles de tumeurs humaines greffées sur souris ou PDX pour Patient Derived tumor Xenografts. Ces modèles développés au cours des dernières années sont donc des souris porteuses d'une tumeur humaine. Ce sont actuellement les seuls qui permettent de reconstituer sur animal la complexité des tumeurs humaines. Les résultats obtenus sur ces modèles permettent ainsi une réelle extrapolation en médecine humaine. Nous disposons actuellement d'une collection de plus de 160 PDX différentes représentatives des tumeurs solides.

Concernant la règle des 3Rs,

Remplacement : Il est essentiel, avant toute administration à l'Homme, de valider le potentiel thérapeutique de chaque traitement innovant dans des modèles permettant d'étudier tous les paramètres observables, depuis l'administration jusqu'à l'élimination des composés administrés tout en prenant en compte les interactions possibles avec les cellules non-tumorales de l'organisme. Ces études *in vivo* constituent une des nombreuses étapes du développement préclinique d'un médicament mais ce travail sur animal ne peut être remplacé.

Réduction : Les modèles de PDX utilisés sont parfaitement maîtrisés et permettent de n'utiliser que le nombre strictement nécessaire d'animaux pour obtenir des résultats pertinents. Les traitements retenus pour ce projet auront été sélectionnés au préalable lors d'études *in vitro* permettant la réduction du nombre de groupe à tester. Il sera, de plus, possible d'évaluer plusieurs traitements au sein d'une même étude, sur un même modèle tumoral (1 seul groupe contrôle pour plusieurs traitements différents) et ainsi réduire le nombre total d'animaux inclus dans le projet.

Toujours d'après les résultats *in vitro*, seuls les traitements démontrant les meilleurs effets anticancéreux seront testés *in vivo* permettant au mieux de réduire le recours aux études *in vivo* aux traitements ayant le meilleur potentiel thérapeutique anticipé.

Raffinement : Nous utiliserons toutes les données compilées préalablement dans le cadre du développement préclinique du traitement à évaluer. Ceci permettra de prédéfinir les doses potentiellement efficaces et minimisant les effets secondaires. Nous pourrons ainsi raffiner l'étude en étant certain de travailler à des doses permettant d'évaluer l'efficacité des traitements et non leur toxicité, en minimisant ou supprimant tout effet secondaire indésirable pouvant masquer l'objet de l'étude.

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

Le projet dont la durée sera de 2 années sera constitué de 40 études visant à évaluer différents traitements innovants sur différents modèles de PDX. Les études comprendront chacune 150 animaux au maximum, soit un total de 6000 animaux au maximum.

11537 Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant et l'adulte jeune. Les gliomes malins infiltrant du tronc cérébral (ou DIPG), qui représentent

10 à 15% des tumeurs cérébrales pédiatriques, sont les formes les plus graves et les plus mal connues sur le plan biologique. Ces tumeurs sont inopérables en raison de leur nature infiltrante et de leur localisation profonde dans le tronc cérébral. Elles sont chimiorésistantes et la radiothérapie, traitement standard, n'est efficace que transitoirement. En cela, ces tumeurs sont universellement incurables et constituent le plus grand défi thérapeutique de l'oncologie pédiatrique à ce jour. Actuellement, peu de modèles d'étude de cette maladie sont disponibles et l'exploration de l'activité de nouvelles thérapeutiques reste encore très limitée. Nous avons récemment réussi à développer des modèles de xénogreffes à partir de lignées de cellules souches cancéreuses établies à partir de prélèvements tumoraux de patients atteints de DIPG. Ces tumeurs, modifiées *in vitro*, sont bioluminescentes et peuvent être suivies au cours du temps par imagerie limitant ainsi le nombre d'animaux employés dans l'étude.

La réponse à la radiothérapie dans le DIPG n'est pas homogène, les tumeurs possédant une mutation dans le gène TP53 répondent beaucoup moins bien au traitement. Nous avons réalisé un crible *in vitro* sur deux lignées représentant ce sous-groupe le plus agressif du DIPG. Le gène CHK1 a alors été identifié comme cible thérapeutique potentielle. Le prexasertib est une molécule capable d'inhiber spécifiquement les protéines CHK1. Nous avons confirmé cet effet *in vitro* sur des lignées primaires de cellules dérivées de DIPG et montré une synergie de la combinaison du prexasertib avec la radiothérapie. Il est nécessaire à présent d'évaluer l'effet du prexasertib sur des xénogreffes *in vivo*, seule possibilité de représenter un organisme entier (métabolisation des molécules, toxicité, ...), avant de pouvoir soutenir l'introduction du médicament en clinique. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'activité antitumorale *in vivo* de la molécule anticancéreuse nommée prexasertib.

La contrainte pour les animaux sera la greffe de cellules tumorales au niveau cérébral ainsi que les traitements thérapeutiques testés. Le suivi du développement tumoral sera fait par imagerie *in vivo* non invasive (bioluminescence), permettant de limiter de façon très importante la taille des développements tumoraux.

Les procédures seront réalisées sous anesthésie gazeuse et une analgésie sera pratiquée en post-opératoire et dès l'apparition d'au moins un signe clinique pour éviter toute souffrance. Les points limites seront strictement appliqués. Les animaux seront hébergés en groupe et le milieu sera enrichi. Les animaux auront un examen clinique et une pesée quotidiens. L'ensemble de ce projet comprend l'utilisation d'au maximum 80 souris. Toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale pour limiter la douleur et le stress des animaux.

11538 L'identification de gènes impliqués dans le développement musculaire présente des applications tant en élevage qu'en santé animale et humaine. Elle permet en effet de rechercher dans les populations d'animaux de rente les gènes favorables pour un développement musculaire optimal. Elle ouvre également des perspectives de nouveaux traitements thérapeutiques pour régénérer une croissance musculaire suite à certains traumatismes ou dans le cas de pathologies génétiques.

Le gène étudié dans le présent projet a été identifié suite à une série d'études menées avec des cultures de cellules de muscle de souris (lignée cellulaire C2C12) et leur invalidation est associée à une prolifération plus importante des cellules et/ou une augmentation de leur volume. Cette première étape était donc essentielle et participe au principe de réduction car elle a permis de sélectionner ces deux gènes d'intérêt sans utiliser d'animaux. Le but du projet est de confirmer cet effet *in vivo*, par l'analyse de souris transgéniques invalidées pour ce gène, et de rechercher d'autres effets éventuels sur d'autres tissus. Le choix de la souris est justifié par i) son métabolisme musculaire proche de celui des animaux de rente et de l'homme, ii) la bonne connaissance de la génétique de cette espèce et l'abondance d'outils pour son étude, iii) ses caractéristiques de reproduction avec une forte prolificité associée à un faible intervalle de génération et iv) l'efficacité des outils disponibles pour éditer son génome. La méthode envisagée permet de limiter le nombre d'animaux en expérimentation, par des croisements raisonnés permettant l'obtention conjointe des souris invalidées et de leurs contrôles.

Les principaux caractères analysés, sur deux lignées indépendantes invalidées pour le gène d'intérêt et la lignée contrôle, seront : l'analyse du poids, des paramètres biochimiques et du phénotype musculaire de la naissance à 6 mois (210 souris), l'étude de la mise en place du tissu

musculaire au stade embryonnaire et fœtal (20 souris), l'étude de la capacité de régénération musculaire suite à une lésion musculaire induite (144 souris) et enfin, la mise en place d'une culture de cellules souches musculaires (45 souris). Ainsi, 419 souris seront nécessaires pour l'ensemble du projet sur une durée de 5 ans, incluant les animaux utilisés pour la cryopréservation des lignées.

Dans un souci de respect de la règle des 3R, les animaux utilisés pour les prélèvements sanguins seront également utilisés pour les prélèvements post-mortem d'échantillons musculaires. De plus, la mise en place d'une culture primaire permettra des études moléculaires limitant l'utilisation du modèle *in vivo*.

Cette étude permettra de mieux comprendre les voies métaboliques impliquées et d'appréhender les voies thérapeutiques envisageables. Les souris bénéficieront dans chaque cage d'un enrichissement de leur milieu (rouleau en carton, coton dentaire, morceau de bois). Les animaux seront en groupe pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement. Cela permet d'intervenir rapidement et de manière appropriée si un problème était constaté. Ce projet, mené en collaboration entre différents laboratoires, a été approuvé par l'évaluation HCERES.

11539 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'une série de 5 composés en développement, de type probiotiques, destinés à l'amélioration des troubles métaboliques, notamment l'obésité. L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ce composé sur la prise alimentaire, le poids corporel et la régulation glycémique chez des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique (60% de l'énergie issue des graisses) pendant 12 semaines. Le traitement sera administré par voie orale pendant les 12 semaines de régime (T1 à T86).

Au cours du traitement, les paramètres suivants seront mesurés : poids corporel, prise alimentaire, glycémie, taux de triglycérides, de cholestérol total, de HDL et de LDL, taux d'II-1beta, d'II-6 et de TNFalpha, test de tolérance oral au glucose (OGTT), insulinémie, composition corporelle

La présente étude nécessitera l'emploi de 120 souris C57Bl/6 réparties en 12 groupes expérimentaux de 10 animaux (6 groupes composés de mâles et 6 groupes composés de femelles). L'ensemble des groupes sera nourri avec un régime enrichi en graisses (60% de l'énergie issue des graisses). Pour chaque genre, nous emploierons un groupe contrôle (traité au véhicule) et 5 groupes expérimentaux traités par l'un des 5 composés tests.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

- Raffinement : Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et les troubles métaboliques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages collectives (2 à 3 souris/cage) et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté pour chaque série expérimentale en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et les troubles métaboliques.

11540 Face à l'augmentation de la population mondiale, nourrir la planète de manière durable est un défi majeur. L'aquaculture est une filière d'avenir car elle produit des nutriments sains tout en stimulant

le commerce local et en préservant les réserves naturelles de poissons. Cependant, son développement est freiné par l'impact de maladies infectieuses.

Flavobacterium psychrophilum (Fp), bactérie responsable de la flavobactériose des salmonidés, dont la truite arc en ciel, peut conduire à des taux de mortalité et à des pertes économiques considérables. En absence de vaccins efficaces, les antibiotiques sont le seul moyen de lutte contre la maladie, et la mise au point de stratégies alternatives de lutte (vaccins, probiotiques, sélection génétique etc.) est essentielle à l'avenir de ce secteur.

Nos projets de recherche visent à :

- mieux comprendre les mécanismes de virulence de la bactérie en soumettant les truites arc-en-ciel à différents isolats bactériens génétiquement caractérisés. Le niveau de virulence de ces isolats est évalué par des cinétiques de mortalité et par quantification de la bactérie dans les poissons.
- identifier les facteurs participant à la résistance de la truite à Fp. Les études portent notamment sur le rôle du microbiote de la peau de la truite. Les poissons soumis à une infection expérimentale sont analysés par différentes approches immunologiques, moléculaires et bactériologiques.

Nos projets s'inscrivent dans une démarche compatible avec la règle des 3R :

- nous veillons à réduire les effectifs de poissons autant qu'il est possible pour obtenir des résultats significatifs, en tenant compte des mortalités estimées, et nous effectuons les expériences dans un environnement optimal pour les animaux.
- les procédures décrites ne peuvent être remplacées par des expériences sur des lignées cellulaires (*in vitro*) car elles visent à comprendre la réaction de l'organisme à la bactérie pathogène.
- les animaux sont gardés en lots, ce qui est important pour le bien-être des poissons, et constitue un élément important d'enrichissement du milieu. Il doit être noté qu'il est important de ne pas introduire dans les bacs des objets sur lesquels les poissons se frottent : même lorsqu'ils ne se blessent pas ce faisant, l'intégrité du mucus est souvent altérée ce qui fragilise l'animal.

Ce projet se décline en 3 procédures qui pourront être répétées plusieurs fois, le total des animaux utilisés pour l'ensemble de ce projet ambitieux est donc de 14800. Ces poissons seront employés pour des évaluations de dose létale de Fp (DL50) (2400 alevins) et pour la caractérisation des interactions hôtes pathogènes entre truite et Fp après infection par balnéation (11200 alevins) ou injection lorsque la dose administrée doit être précisément contrôlée (1200).

Les infections expérimentales durent au maximum 4 semaines. Pour évaluer la virulence des souches ou la sensibilité des truites à un traitement, les groupes sont constitués de 50 animaux en fonction des observations et des prélèvements à effectuer. L'ensemble des prélèvements est fait post mortem après euthanasie.

11541 Un des problèmes majeurs de santé publique actuellement est l'émergence de la résistance aux antibiotiques et des infections nosocomiales. Parmi les souches bactériennes responsables d'infections nosocomiales dans le domaine hospitalier, on trouve notamment des bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli* et *Salmonelle*. Une fois installée, l'infection est très difficile à éradiquer. Surtout lorsque les bactéries secrètent une matrice extracellulaire extrêmement imperméable qui les protège de tout type d'agressions extérieures et qui leur permet d'adhérer à tout type de support. Elles forment alors un biofilm. Ce mode de virulence est très employé par les bactéries car elles se multiplient et colonisent leur hôte très rapidement. De plus, les antibiotiques ou autres agents chimiques deviennent alors inefficaces. Ce phénomène est très problématique dans le milieu médical surtout lors d'implantation de matériel étranger chez l'homme comme par exemple des prothèses vasculaires. Malgré toutes les précautions d'hygiène prises lors des interventions chirurgicales, l'introduction d'un corps étranger dans l'organisme humain peut favoriser la prolifération bactérienne et ainsi devenir un support idéal pour le développement de biofilms.

Récemment, plusieurs articles scientifiques ont fait état de l'inhibition de la formation des biofilms par plusieurs molécules de petite taille, produites naturellement par les bactéries et que l'on appelle les Acides RiboNucléiques régulateurs ou ARNrég. Des résultats préliminaires, obtenus *in vitro*,

montrent que 5 ARN, synthétisés chimiquement sous forme d'Acides Nucléiques Peptidiques (PNA), inhibent la croissance des bactéries, la formation des biofilms en microplaques ainsi que la formation des biofilms, *in vitro*, sur implant de prothèse vasculaire. Chaque PNA a été testé seul ou en combinatoire avec un 2ème PNA afin d'améliorer l'efficacité d'inhibition.

Le but de cette étude est de reproduire l'effet de ces PNA *in vivo*, sur un même implant de prothèse vasculaire et de démontrer l'effet préventif des PNA ; chaque implant sera en effet pré-incubé dans une solution de PNA avant d'être transféré chez l'animal. Empêcher les bactéries de former du biofilm reste sûrement le meilleur moyen d'empêcher l'infection chronique de s'installer.

Le modèle animal choisi est la souris (Swiss, femelles, âgées à 4 à 6 semaines). 492 animaux au maximum sont nécessaires à la réalisation d'une étude complète (Lot de 9 souris / traitement, 13 traitements différents, 2 souches différentes, 2 doses différentes et un lot de 24 souris « contrôle »). Toutes les procédures d'implantation et d'infection de matériel se font sous anesthésie générale de courte durée. Une surveillance quotidienne de chaque animal sera réalisée afin d'évaluer son bien-être et ainsi gérer au mieux la prise en charge de la douleur et de la souffrance avec une évaluation de critères physiques (pelage, yeux, comportement) et physiologiques (température, poids) selon une grille de Morton et Griffith modifiée.

Avec ce modèle *in vivo*, nous recueillerons des données essentielles à la mise au point d'une ou plusieurs molécules inhibitrices de biofilms, susceptibles d'être utilisées dans le milieu médical.

11542 Notre équipe étudie les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la perception douloureuse de la migraine, et en particulier le rôle de protéines membranaires, les canaux ioniques, en développant leur pharmacologie. Nous avons identifié un mécanisme qui génère une protéine qui inhibe TREK1 et TREK2, deux canaux potassiques, étant à l'origine d'une hyperexcitabilité neuronale. La présence de cette protéine *in vivo* a permis de montrer que les canaux TREK1 et TREK2 étaient impliqués dans l'augmentation de l'excitabilité neuronale des ganglions trijumeaux, à l'origine d'un phénotype migraineux, en donnant lieu à une publication de haut niveau scientifique.

Le but de ce projet est de tester les effets *in vivo* d'une nouvelle drogue activatrice des canaux TREK synthétisée par un partenaire industriel, avec le double objectif de mieux comprendre le rôle des canaux ioniques dans la migraine, mais aussi de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques pour le développement de nouveaux antimigraigneux. Notre équipe est à l'origine d'un brevet proposant TREK1 et TREK2 comme cibles alternatives potentielles dans le cadre d'un traitement antimigraigneux.

Nous nous proposons de tester le composé d'intérêt fourni par un partenaire industriel, en regard à deux autres traitements utilisés cliniquement pour traiter la migraine, pour déterminer les effets du composé. Les mécanismes seront étudiés, chez le rat, en modélisant la migraine via l'injection d'un donneur de NO, l'isosorbide dinitrate (ISDN).

L'objectif de Réduction a été pris en compte en réduisant le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre d'animaux total (48 rats) annoncé ici correspond au nombre maximal nécessaire. Il sera réduit chaque fois que possible, et toute expérience rendue inutile par des résultats précédents obtenus par nous ou d'autres groupes (veille bibliographique mondiale permanente) ne sera pas conduite. L'objectif de Raffinement a été pris en compte en laissant un temps d'habituation adéquat aux rats. En plus d'igloos et de carrés de ouate, des briquettes de bois viendront compléter l'enrichissement des cages ; enfin en limitant le nombre de test comportemental à un (allodynie faciale) dans une durée convenable pour l'animal. Aucune méthode alternative ne permet de satisfaire l'objectif de Remplacement à notre connaissance car cette étude comportementale nécessite per se une approche *in vivo*. Cela dit, cette approche est grandement motivée par des résultats préliminaires obtenus *in vitro* : la molécule fournie est activatrice des canaux TREK dans les cellules de diverses espèces. En ce qui concerne la toxicité de la molécule : elle a été testée pour son activité sur les canaux ioniques cardiaques et n'a montré aucune activité significative sur les canaux sodium et HCN et une activité limitée sur les canaux potassium. D'autre part, des administrations avec des quantités jusqu'à 5 fois supérieures aux quantités que nous allons utiliser confirment la non toxicité du

composé *in vivo*. Ces études précliniques chez l'animal restent nécessaires au dépôt de brevets et à la poursuite d'études cliniques pour développer de nouveaux traitements antimigraineux.

11543 La dépendance aux drogues est une maladie chronique très grave, avec une morbidité et mortalité relativement élevées. La prévalence de cette maladie se situe entre 0.5 et 2% de la population générale, en fonction du type de drogue. De plus, une augmentation alarmante de l'usage des drogues à des buts récréatifs suggère que l'incidence de la dépendance aux drogues pourrait augmenter de façon dramatique durant les prochaines années.

Les caractéristiques cliniques les plus importantes de la dépendance aux drogues sont les troubles somatiques (musculaires/osseux, digestifs, cardiovasculaires), les états émotionnels négatifs (dysphorie, anxiété, dépression, anhédonie), les troubles motivationnels et cognitifs, la dégradation des relations sociales et l'auto-isolement. Notamment, les sujets dépendants aux drogues montrent une vulnérabilité accrue aux événements stressants. En effet, même après des longues périodes d'abstinence, des événements relativement peu stressants peuvent déclencher une « rechute » vers la recherche et prise de drogue.

A ce jour, aucune thérapie efficace n'existe pour le traitement de la dépendance aux drogues. Par exemple, le traitement courant de la dépendance aux drogues opiacées est représenté par des drogues opiacées de « substitution », comme la méthadone et la buprénorphine. Néanmoins, comme l'on pourrait imaginer, ces drogues sont elles-mêmes addictives. En effet, dans plusieurs pays européens on constate leur disponibilité sur le marché illicite et leur usage à but récréatif. De plus, méthadone et buprénorphine sont souvent la cause de décès par surdose. Le développement de nouvelles thérapies reste ainsi un des objectifs les plus importants de la recherche sur la dépendance aux drogues.

Des études suggèrent des altérations importantes de certains systèmes de réponse au stress dans la dépendance aux drogues. Le système du corticotropin-releasing factor (CRF) est un coordonnateur majeur des réponses au stress. A l'aide de paradigmes expérimentaux murins novateurs nous avons mis en évidence un rôle clé pour ce système dans les effets des drogues opiacées et psychostimulantes. Notamment, nous avons démontré que l'inactivation génétique des récepteurs au CRF (CRF1 et CRF2) élimine complètement les comportements liés aux états affectifs négatifs ou les signes somatiques du sevrage aux drogues opiacées ou psychostimulantes. Comme mentionné ci-dessus, la vulnérabilité au stress est une caractéristique majeure de la dépendance aux drogues. En effet, des événements stressants peuvent déclencher la recherche et prise de drogue, même après de longues périodes d'abstinence. Cependant, à ce jour très peu d'études ont concerné l'implication des systèmes de réponse au stress dans la vulnérabilité au stress chez des sujets dépendants aux drogues.

Au travers d'études comportementales de sévérité légère, nos recherches visent à déterminer le rôle de certains systèmes de réponse au stress (ex. CRF, noradrénaline, vasopressine, ocytocine) dans les altérations émotionnelles, motivationnelles et du comportement social induites par les drogues. Ainsi, nous utiliserons l'antagoniste pharmacologique du CRF antalarmin et des modèles de souris génétiquement modifiées pour les récepteurs au CRF (CRF1^{-/-}, CRF2^{-/-}) qui ne présentent aucun phénotype dommageable. Afin de réduire l'expression du CRF1 ou du CRF2 dans des régions cérébrales spécifiques, nous utiliserons des lentivirus constitués de particules virales complètement dépourvues de tout potentiel pathogène et qui ont déjà été validés par d'autres laboratoires de recherche. Les lentivirus seront injectés par des techniques de chirurgie intracérébrale de sévérité modérée. Ainsi, l'ensemble de nos études pourrait contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes et de la physiopathologie de la dépendance aux drogues, ouvrant des nouvelles pistes pour le traitement pharmacologique de ces graves pathologies.

Notre projet de recherche respecte et applique les exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement en matière d'expérimentation animale. Nos procédures expérimentales ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. En effet, nos études nécessitent l'utilisation de modèles animaux élaborés capables de reproduire la pathologie humaine. Par exemple, nos

questions de neurobiologie nécessitent certaines méthodes invasives (administration de drogue, lentivirus) et la récupération des cerveaux après euthanasie, qui ne peuvent être réalisées que chez l'animal. Ainsi, à notre connaissance, à ce jour aucun modèle *in vitro* ou informatique ne permet d'aborder nos objectifs scientifiques. Nous utiliserons donc 500 souris (*Mus musculus*) pour nos études. Plusieurs étapes du projet détaillées ci-après permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés sans compromettre les objectifs et résultats de nos recherches. De plus, lors des chirurgies pour l'injection intracérébrale de lentivirus, des procédures de raffinement seront mises en place afin de prévenir et/ou réduire la douleur des animaux. Ainsi, des souris seront d'abord prémédiquées avec un médicament analgésique anti-inflammatoire et l'injection de lentivirus effectuée sous anesthésie générale par isoflurane.

Finalement, le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en œuvre uniquement par du personnel technique de recherche formé et qualifié et respecte la règle des 3R. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet. Ainsi, pour le garantir les animaux seront hébergés selon les standards prévus par la réglementation : en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi. Des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux. Plus particulièrement, nous mettrons en place une surveillance accrue des animaux après l'exposition à l'anesthésie générale ou aux drogues afin de réagir et interrompre l'expérimentation si l'animal atteint un point limite.

11544 De nombreux agents pathogènes, notamment les flavobactéries, affectent les salmonidés en Europe et dans le monde. *Flavobacterium psychrophilum* (Fp), bactérie responsable de la flavobactériose des salmonidés, peut conduire à des taux de mortalités et à des pertes économiques considérables. En l'absence de vaccins efficaces, les antibiotiques sont le seul moyen de lutte contre la maladie. Pour limiter leur utilisation et les risques de développement d'antibio-résistances, la mise au point de stratégies alternatives de lutte (vaccins, utilisation de probiotiques, sélection génétique etc.) est essentielle pour l'avenir de ce secteur d'activités. La vaccination devra être complétée par de bonnes pratiques d'élevage et par l'utilisation de substances immuno-stimulantes ou immuno-modulatrices du système immunitaire car l'optimisation des formules alimentaires modernes avec des ingrédients d'origine végétale est un facteur fragilisant le système immunitaire des poissons d'élevage carnivores. Parmi les nombreux additifs présents sur le marché et revendiquant des propriétés immunostimulantes, les prébiotiques (constituants alimentaires), les probiotiques (bactéries), les hydrolysats protéiques, les bactériophages et les ingrédients d'origine marine représentent une solution d'avenir pour améliorer les performances de l'aquaculture. Leur richesse en peptides bioactifs (antimicrobiens, antioxydants, immuno-modulateurs...), composés azotés solubles hautement biodisponibles et leur très haute valeur nutritionnelle pourraient permettre d'améliorer significativement le statut physiologique des animaux et, par conséquent, leur résistance aux pathogènes.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les performances immuno-modulatrices des aliments expérimentaux (granulés extrudés) distribués manuellement 2 à 4 fois par jour chez la truite arc-en-ciel soumise à une infection bactérienne expérimentale maîtrisée.

La truite arc-en-ciel, première espèce d'élevage piscicole d'eau douce en Europe, a été choisie car elle est un modèle reconnu pour l'étude des pathologies affectant les salmonidés notamment la flavobactériose.

Ce projet se décline en 1 procédure et le total des animaux utilisés sera de 10 000 poissons maximum sur 5 ans. La procédure expérimentale implique 4 lots de 50 poissons infectés par balnéation dans une suspension de *Flavobacterium psychrophilum*, et un lot témoin de 50 poissons non infectés, soit un total de 250 poissons par aliment expérimental. La procédure sera répétée en fonction du nombre d'aliments expérimentaux à tester. Par an, nous réaliserons au maximum 2 prestations testant 4 aliments expérimentaux, ce qui représente un total de 2000 poissons par année.

La survie des animaux sera suivie pendant 4 semaines et les groupes comparés. Ce suivi sera associé à des prélèvements de matériel biologique effectués après euthanasie des animaux pour caractérisation au laboratoire.

Des critères d'arrêt : nage erratique, détresse terminale, non réponse à des stimuli externes ont été définis et seront à l'appréciation des techniciens.

Ce projet s'inscrit dans une démarche compatible avec la règle des 3R :

- nous veillons à réduire les effectifs de poissons autant qu'il est possible pour obtenir des résultats significatifs, en tenant compte des mortalités estimées, et nous effectuons les expériences dans un environnement optimal pour les animaux.

- les procédures décrites ne peuvent être remplacées par des expériences sur des lignées cellulaires (*in vitro*) car elles visent à comprendre la réaction de l'organisme dans son intégralité à la bactérie pathogène.

- Toutes les manipulations génératrices de stress : tris, transferts, pesées sont compensées par une anesthésie. Les individus qui ont atteint le stade moribond (qui est notre point limite dans ce projet) sont sortis du protocole et euthanasiés (surdosage d'anesthésique, benzocaïne ou tricaine à 300 mg/l). Le stade moribond correspond à une nage erratique signe d'un état de détresse avancée (hyper ou sous ventilation, choc osmotique, nageoire caudale rongée.), l'animal ne répond plus aux stimuli physiques.

Les animaux sont gardés en lots, aucun animal ne sera isolé ce qui est très important pour le bien-être des poissons. La présence de congénères constitue un élément important d'enrichissement du milieu. De plus, c'est la seule possibilité dont nous disposons, l'ajout d'objet dans les aquariums pouvant provoquer des blessures et rendre les observations des animaux très difficiles.

11545 La pneumonie aigüe communautaire (PAC) est une infection respiratoire acquise en dehors du milieu hospitalier. La PAC est la première cause de mortalité infectieuse dans les pays occidentaux et elle représente aujourd'hui un problème majeur de santé publique. L'OMS estime l'incidence annuelle de la PAC à 450 millions de cas dans le monde, pour près de 4 millions de décès. Les enfants de moins de cinq ans et les adultes âgés de plus de 75 ans sont plus particulièrement touchés. Différents types de pneumonies sont décrites selon leur origine infectieuse : les pneumonies dites « bactériennes », les pneumonies dites « virales » et les pneumonies « mixtes » (virales et bactériennes). Parmi les pathogènes les plus retrouvés dans ces infections, nous citerons : la bactérie *Streptococcus pneumoniae* ainsi que le virus de la grippe (virus Influenza). Afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces, il est donc indispensable de mieux comprendre les processus physiopathologiques impliqués dans les dégâts tissulaires et la morbi-mortalité des patients.

L'un des mécanismes par lequel les neutrophiles contribuent à l'apparition de ces dégâts tissulaires pourraient être dépendants de leur capacité à sécréter un facteur inflammatoire particulier appelé interleukine-1 β . Nos travaux précédents ont démontré que le neutrophile constitue une source rapide et importante d'interleukine-1 β au cours des infections respiratoires. Ainsi grâce à l'utilisation d'une souris présentant un défaut sélectif du gène codant pour la protéine caspase-1 (indispensable à la synthèse d'interleukine-1 β) au sein des neutrophiles, nous évaluerons l'impact de cette déficience sur certains paramètres microbiologiques (charge microbienne), histologiques et immunitaires (recrutement cellulaire, facteurs inflammatoires).

Pour répondre à cette hypothèse, nous envisageons de tester deux pathogènes respiratoires de relevance clinique (*Streptococcus pneumoniae* et le virus Influenza A). Trois doses différentes pour chaque pathogène seront testées sur les animaux déficients pour la protéine caspase-1 du neutrophile et les souris contrôles afin de mimer différents niveaux de sévérité. De plus, trois temps d'analyse (en point final) seront nécessaires afin d'évaluer notre hypothèse à différents stades de l'infection. Ainsi un total de 360 souris seront nécessaires.

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

- Remplacement : Jusqu'à présent, aucun système *in vitro* ne permet de reproduire les caractéristiques d'infections respiratoires et le modèle murin constitue un modèle expérimental pertinent.

- Réduction : Pour limiter le nombre d'animaux, nous estimons à 15 % minimum la différence de nos moyennes et nous souhaitons une puissance de test de 90% minimum. Pour chaque condition (2 pathogènes, 3 doses/pathogène, 3 temps d'analyse), 10 souris de souche sauvage et 10 souris déficientes seront donc nécessaires. Un maximum d'analyses sera effectué sur chaque animal (cellules immunitaires, cytokines, expression des gènes, histologie, évaluation de la charge du pathogène). Ainsi un total de 360 souris sera nécessaire.

- Raffinement : Les animaux seront élevés en communauté dans des cages enrichies avec du sopalain et fragments de boîtes d'œufs. Afin de limiter le stress lié à l'inoculation, les souris seront anesthésiées par un mélange de kétamine 70 mg/kg - xylazine 14 mg/kg (injecté par voie intrapéritonéale). Les animaux sont suivis plusieurs fois par jour et pour détecter les signes cliniques précoces et afin de prendre une décision rapide en cas d'atteinte des points limites durant tout le protocole et de limiter la douleur induite.

11546 Au cours de l'insuffisance rénale chronique (IRC), le syndrome urémique se caractérise par une accumulation de déchets normalement éliminés par le rein et appelés toxines urémiques. Elles jouent un rôle majeur dans les comorbidités associées à l'insuffisance rénale chronique et participent à l'augmentation de la mortalité globale et cardiovasculaire associée à cette maladie. Les toxines urémiques les plus étudiées sont le p-cresyl sulfate (PCS) et l'indoxyl sulfate (IS) issues de la fermentation des protéines alimentaires par le microbiote intestinal. La dysrégulation du microbiote intestinal au cours de l'IRC semble être un facteur clé dans la génération de ces toxines. La modulation du microbiote (fibres, probiotiques) peut diminuer leurs concentrations, cependant les résultats restent pour l'instant contradictoires. Le PCS et l'IS sont peu éliminés par les techniques de suppléance rénale telle que l'hémodialyse, Il est donc urgent de trouver des stratégies pour diminuer leur production.

L'altération du microbiote intestinal est actuellement à l'étude dans de nombreux domaines, et de plus en plus d'associations sont faites avec des pathologies telles que les maladies inflammatoires intestinales, les maladies neuro-dégénératives, etc ... La transplantation fécale est ainsi une option thérapeutique qui pourrait être profitable aux patients dans certaines maladies, via la restauration d'un microbiote sain. Chez les patients IRC la flore bactérienne intestinale dominante est différente de celles des sujets sains et pourrait contribuer à une génération accrue de toxines urémiques.

Le recours au modèle animal s'impose pour cette étude étant donné l'impact systémique de la maladie rénale chronique. Nous nous proposons d'explorer dans un modèle de souris insuffisantes rénales, induite par un régime alimentaire spécifique, le bénéfice d'une transplantation fécale issue de souris contrôles. Les fèces des souris saines seront collectées et conditionnées en vue de la réalisation de la transplantation fécale. Celle-ci sera réalisée par gavage des souris dans les 24-48h suivant le recueil, puis renouvelée à J7 et J14. L'impact de cette transplantation fécale sera étudié sur divers paramètres métaboliques ainsi que sur la production de toxines urémiques et l'inflammation. Une analyse du microbiote intestinal des souris à distance de la transplantation sera également réalisée pour évaluer la pérennité de cette thérapeutique. Quatre groupes de 10 souris C57bl6J seront utilisées soit 40 souris (20 souris urémiques et 20 souris contrôle). Un sous-groupe supplémentaire de 5 souris urémiques recevra une seule transplantation fécale à J1, afin d'étudier la cinétique de modification du microbiote. Nous espérons observer, à la suite de la transplantation fécale, une diminution de la production de toxines urémiques et un bénéfice sur les complications associées à ces toxines (inflammation, insulino-résistance, dysfonction adipocytaires, lésions vasculaires).

Conformité à la règle des 3 R : S'agissant d'une maladie systémique (syndrome urémique), toute expérimentation *in vitro* et/ou méthode substitutive est impossible et il nous est nécessaire de recourir à une expérimentation animale. Le nombre d'animaux nécessaire à cette étude (45 souris) a toutefois été calculé au plus juste afin d'offrir la puissance statistique maximum. Raffinement : L'induction de l'insuffisance rénale sera réalisée chez la souris par une méthode non chirurgicale

(cad par une méthode nutritionnelle) afin d'éviter le stress et les douleurs post-opératoires. Les procédures susceptibles d'être douloureuses telles les prélèvements sanguins sont réalisés sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane afin de prévenir toute douleur. Chaque animal ne subit en outre qu'un et un seul prélèvement sanguin afin de limiter l'inconfort. Un enrichissement du milieu de vie à l'aide d'igloos en carton et de ouate de cellulose (permettant au souris de se fabriquer un nid) sera mis en œuvre pour l'hébergement des souris.

11547 Les infections bactériennes pulmonaires posent des problèmes thérapeutiques car certaines souches sont résistantes aux antibiotiques et ceux-ci diffusent mal dans les sites infectés.

Le développement d'antibiotiques à nouveaux modes d'action et d'administration est limité. Le développement de nouveaux types de traitements antibactériens apparaît donc comme une alternative pour économiser l'arsenal antibiotique et constituer un dernier recours face aux bactéries multi-résistantes. Leur administration par voie pulmonaire permettrait leur concentration dans le poumon qui est un organe difficilement accessible par la voie classique intra veineuse.

Un nouveau traitement antibactérien a été développé par un collaborateur privé. Il est efficace contre plus de 600 souches d'une bactérie opportuniste connue pour être multi-résistante et responsable d'infections respiratoires acquises sous ventilation mécanique, c'est à dire lorsque l'état du patient a nécessité sa mise sous respirateur artificiel après anesthésie et intubation.

Cette saisine fait suite à celle déposée et acceptée pour réaliser la preuve de concept de l'efficacité du traitement chez la souris. La suite du projet, présentée dans cette saisine est découpée en six procédures afin d'apporter les prérequis techniques et les arguments scientifiques nécessaires pour établir un dossier réglementaire afin de débiter des essais cliniques chez l'Homme.

Les objectifs des études décrites dans cette saisine sont :

1) Mise au point d'un modèle porcin d'infection aigüe à *Pseudomonas aeruginosa* sous ventilation mécanique invasive (condition d'utilisation du traitement envisagée chez l'homme). Les animaux seront donc anesthésiés, intubés et placés sous respirateur.

2) Etude de l'efficacité thérapeutique et de la pharmacocinétique du médicament administré par voie pulmonaire, dans le modèle porcin.

Le traitement sera administré par un nébuliseur dont le développement est intégré au projet.

Le nombre de porcs maximum nécessaire à cette étude est de 40.

Les expérimentations ont été planifiées selon la règle des « 3R ». Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse thérapeutique d'un organisme entier à une infection et sont insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Réduire : les expériences ont été planifiées dans un ordre précis pour pouvoir réduire le nombre d'animaux. Le nombre minimal d'animaux pour obtenir des résultats robustes a été calculé en fonction des tests statistiques utilisés.

Raffiner : les administrations seront réalisées sous anesthésie générale. Les animaux avant les interventions seront élevés ensemble (enrichissement social) dans un local adapté avec des ballons et chaines. Tout au long du déroulement des expériences, une observation systématique de leur état clinique sera réalisée par les animaliers et/ou l'expérimentateur.

11548 Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant et l'adulte jeune. Les gliomes malins infiltrant du tronc cérébral (ou DIPG), qui représentent 10 à 15% des tumeurs cérébrales pédiatriques, sont les formes les plus graves et les plus mal connues sur le plan biologique. Ces tumeurs sont inopérables en raison de leur nature infiltrante et de leur localisation profonde dans le tronc cérébral. Elles sont chimiorésistantes et la radiothérapie, traitement standard, n'est efficace que transitoirement. En cela, ces tumeurs sont universellement incurables et constituent le plus grand défi thérapeutique de l'oncologie pédiatrique à ce jour. Actuellement, peu de modèles d'étude de cette maladie sont disponibles et l'exploration de l'activité de nouvelles thérapeutiques reste encore très limitée. Nous avons récemment réussi à développer huit modèles de xénogreffes à partir de lignées de cellules souches cancéreuses établies à partir

de prélèvements tumoraux de patients atteints de DIPG. Ces tumeurs, modifiées *in vitro*, sont bioluminescentes et peuvent être suivies au cours du temps par imagerie limitant ainsi le nombre d'animaux employés dans l'étude.

En 2017, une étude clinique de phase 2 a montré que la tumeur d'une patiente semblable à un DIPG répondait au médicament anticancéreux nommé ONC201. De plus, cette molécule a montré un effet anti-tumoral *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de glioblastome en préclinique. Nous avons confirmé cet effet anti-tumoral *in vitro* sur des lignées primaires de cellules dérivées de DIPG. Il est nécessaire à présent d'évaluer l'effet de l'inhibition de ONC201 *in vivo*, seule possibilité de représenter un organisme entier (pharmacocinétique, toxicité, ...), avant de pouvoir soutenir l'identification du médicament et un passage vers la clinique. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'activité antitumorale *in vivo* de la molécule anticancéreuse nommée ONC201.

Une singularité des gliomes du tronc cérébral résulte dans leur phénotype systématique d'infiltration des structures normales, l'absence de masse tumorale et l'importante capacité d'invasion du tronc cérébral dans un premier temps, puis plus largement du cerveau au décours de la maladie. Ces particularités résultent des interactions des cellules tumorales avec leur stroma qui ne peuvent être appréhendées que dans des animaux vivants, où la variété et complexité du microenvironnement tumoral existe. De plus, la barrière-hématoencéphalique est une limitation très importante dans le traitement de cette maladie (barrière non rompue) et il est indispensable d'évaluer les traitements sur animaux vivants aussi pour cette raison.

Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Les animaux seront hébergés en groupe et le milieu sera enrichi. Les animaux auront un examen clinique et une pesée quotidiens. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale pour limiter la douleur et le stress des animaux. Les animaux seront pesés et examinés trois fois par semaine au début, puis quotidiennement avec des tumeurs au stade avancé. L'ensemble de ce projet nécessitera l'utilisation d'au maximum 230 souris.

11549 Contexte et objectifs :

Le projet a pour but d'évaluer l'efficacité par épreuve de candidats médicaments destinés à l'espèce poule contre une pathologie aviaire.

Pour qu'un médicament soit commercialisé, il faut démontrer que celui-ci apporte un bilan risques/bénéfices favorable pour cette pathologie.

Pour démontrer l'efficacité d'un médicament contre un agent pathogène, la mise au point d'un modèle d'épreuve est indispensable. L'épreuve correspond à l'administration de l'agent pathogène pour reproduire de manière expérimentale et le plus fidèlement possible, les conditions réelles de développement de la pathologie.

Des études d'amplification *in vivo* de la souche d'épreuve chez l'animal peuvent être nécessaires pour obtenir une souche utilisable dans une épreuve expérimentale.

Avantages/dommages :

La finalité de ces études est la mise au point de médicaments d'un niveau d'efficacité satisfaisant. Ceux-ci sont essentiels en élevage afin de protéger les animaux contre les maladies infectieuses et garantir les performances zootechniques et économiques.

Le développement de la maladie chez l'animal peut donner lieu à des signes cliniques. De plus, l'administration du pathogène et les prélèvements peuvent également générer du stress et une gêne.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique des produits testés, sur les exigences réglementaires et les projets de Recherche et Développement (R&D) à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 1500 poules.

Mise en œuvre des 3R's :

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un médicament consiste à tester *in vitro* différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

Un recueil d'informations est également apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Le recours à l'espèce cible du produit développé (ici l'espèce poule) ou sensible à la (aux) souche(s) utilisée(s) est, à l'heure actuelle, une exigence réglementaire ; cela permet d'observer, la plus fidèlement possible, les effets sur les espèces qui pourront bénéficier de ces traitements.

Réduction : Concernant les études réglementaires, le nombre minimal d'animaux à inclure est fixé par les textes. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (historique, définition des objectifs, tests statistiques de puissance...) de façon à limiter le nombre d'animaux utilisés et les études non conclusives.

Raffinement :

Des points limites ont été définis afin de limiter le plus précocement possible une dégradation de l'état général des animaux. Ces critères sont en constante évolution de manière à ce qu'ils reflètent au mieux l'expérience du terrain et l'état actuel des connaissances vétérinaires.

Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux afin de maximiser leur confort et leur bien-être. Les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements du milieu sont installés dans les hébergements. La Structure en charge du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

11550 Le cancer du poumon, dont on distingue deux formes : à petites cellules et non à petites cellules (le plus fréquent), est le cancer le plus meurtrier dans le monde. Son incidence est en constante augmentation. Son pronostic est toujours largement conditionné par la possibilité d'en effectuer une exérèse chirurgicale, mais celle-ci n'est possible que lorsqu'il est encore peu étendu. Toutefois, même dans ces cas, en association ou non avec une chimiothérapie et/ou une radiothérapie, le pourcentage de guérison reste très faible, sans parler des formes étendues non opérables, en particulier avec extension métastatique, sur lesquelles la chimiothérapie a peu d'effet. Le pronostic global est donc très mauvais, la survie à 5 ans ne dépassant pas 15%.

Dans ce contexte, l'immunothérapie suscite un grand intérêt. Son objectif est d'amplifier la réponse du système immunitaire contre les cellules cancéreuses. Les avancées récentes dans notre compréhension de la régulation des fonctions des cellules immunitaires ont permis l'émergence de ces nouvelles immunothérapies anti-tumorales. Ainsi, plusieurs thérapies fondées sur l'utilisation d'anticorps ont montré un bénéfice clinique dans plusieurs cancers, y compris le cancer du poumon et le cancer de la peau. Néanmoins, bien que ces traitements aient permis d'améliorer la survie de certains patients, le taux de réponse reste limité dû aux mécanismes développés par la tumeur pour inhiber les fonctions immunitaires. L'objectif de ce projet consiste à élucider le rôle anti-tumoral de certaines cellules immunitaires infiltrant les tumeurs *in vivo* dans un modèle de souris greffées avec des lignées tumorales. Notre programme vise à potentialiser les immunothérapies anti-cancéreuses actuelles en optimisant le recrutement des globules blancs dans les tumeurs.

Nous avons identifié des facteurs du microenvironnement tumoral impliqués dans la régulation des activités des cellules immunitaires. Ce sont des molécules qui influencent de manière opposée l'activité des cellules. En effet, alors que l'une améliore les capacités des cellules immunitaires à tuer les cellules tumorales, la deuxième, au contraire, inhibe ces fonctions.

Les objectifs de ce projet consisteront à : Déterminer le rôle exact de ces molécules dans les fonctions antitumorales des cellules immunitaires ; élucider leurs rôles dans la fonctionnalité des cellules immunitaires et dans les thérapies anti-tumorales dans des expériences *in vivo*, étudier le développement, le rôle et les fonctions d'un sous-type de cellules immunitaires (appelés TRM) avec fort potentiel anti-tumoral et qui sont présentes dans les tumeurs.

Ce travail consiste à étudier la croissance tumorale en présence ou non de nos molécules d'intérêt et analyser l'infiltrat immunitaire des tumeurs et en particulier le sous-type de cellule TRM.

La molécule CD103 étant un marqueur clé des TRM, nous réaliserons des expériences de réponse antitumorale dans des souris transgéniques knock-out (gène supprimé) pour cette molécule d'intérêt (CD103-KO). Ces souris sont aussi dépourvues de cellules immunitaires TRM.

Concernant les protocoles expérimentaux, des souris CD103-KO et des souris C57Bl/6, sont greffées en sous-cutanée ou en intra-veineux avec une lignée tumorale puis une thérapie anticancéreuse sera administrée dès l'apparition des tumeurs. Il y a deux sortes de thérapies ; soit une vaccination injectée sous-cutanée, soit un anticorps injecté en intra-péritonéal.

Le suivi des souris, la progression tumorale ainsi que la réponse immunitaire globale seront caractérisés après plusieurs injections de la thérapie. Nous pourrons ainsi analyser le rôle antitumoral des cellules immunitaires ainsi que le rôle des cellules TRM dans un contexte de thérapie du cancer.

Les expérimentations in-vivo seront réalisées toutes les 6 semaines pour nous permettre d'analyser les résultats et de modifier le protocole suivant les résultats précédents, obtenus in-vivo et in-vitro, afin de réduire le nombre d'expériences.

L'utilisation d'animaux vivants est indispensable dans ce projet, car elle permettra de voir l'impact des trois molécules étudiées dans un microenvironnement tumoral complexe. De plus le système immunitaire de la souris est proche de l'Homme, ce qui nous permet d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires antitumoraux et protumoraux.

Les souris seront hébergées en groupe pour minimiser le stress de l'isolement. De plus, l'environnement des animaux sera enrichi en permanence par du coton ou des maisons en carton afin de diminuer leur angoisse et favoriser leur bien-être. Les points limites seront strictement appliqués. Le nombre d'animaux sera adapté pour atteindre les objectifs du projet et réduire au minimum le nombre d'animaux. En effet, une analyse statistique a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaire pour détecter des différences significatives tout en réduisant au minimum le nombre d'animaux, qui a été estimé au maximum à 960 souris sur 3 ans. Les animaux seront surveillés quotidiennement. Tous les gestes techniques des procédures expérimentales seront faits sous anesthésie. Les animaux recevant des injections directement dans les tissus bénéficieront d'un protocole antalgique au cours de ces injections (buprénorphine). Les souris seront suivies continuellement pour vérifier leur bien-être, ainsi que pour vérifier que les souris n'arrivent pas aux points limites qui seront strictement appliqués et mesurés.

11551 Le codage de l'information sonore est fortement tributaire de la mise en place au cours du développement de circuits neuronaux le long de la voie auditive. Ainsi, toute atteinte des structures auditives (périphérique ou centrale) est responsable de déficits auditifs. L'étiologie de ces derniers (génétique ou acquise), les structures affectées (sensorielles ou neuronales) et les manifestations cliniques (surdité légère à sévère, acouphènes, hypercausie ou presbycusis) empêchent le développement rapide de thérapies.

Dans ce projet, nous cherchons à déchiffrer les mécanismes contribuant à la perte auditive de type sensorielle, causée par une transmission anormale des sons le long des voies auditives centrales. En particulier, nous souhaitons éclaircir les causes anatomiques et fonctionnelles des déficiences auditives de type génétique, telles que celles dues à la perte de fonction du gène Hoxb1 chez la souris et à des mutations faux sens du gène HOXB1 chez l'homme. Nous envisageons de contribuer à l'identification et caractérisation des populations neuronales et des circuits impliqués dans le système auditif normal et pathologique en utilisant des approches génétiques, moléculaires, cellulaires et électrophysiologiques. Nous employons l'approche intersectionnelle génétique, qui grâce à la combinaison de lignées de souris Cre-loxP et Flp-FRT recombinases, permet de tracer et d'analyser les populations et les circuits nécessaires à l'assemblage correct du système auditif. L'étude du phénotype de ces souris, à savoir la corrélation anatomo-fonctionnelle du système auditif, nous permettra donc de déterminer quelles sont les structures à l'origine de la surdité causée par la mutation du gène Hoxb1. Nous utiliserons des techniques d'analyse histologique post mortem, des immunomarquages et de la détection d'ARN (hybridation in situ) pour suivre la distribution des types cellulaires, la migration cellulaire et leurs projections.

En raison de la complexité anatomique et fonctionnelle de ce système, une dissection génétique et fonctionnelle minutieuse des différentes voies auditives permettra une meilleure compréhension de la façon dont les composants sensoriels et moteurs se forment pendant le développement des circuits auditifs. L'objectif global de ce projet est donc de contribuer à la compréhension des mécanismes impliqués dans les déficits auditifs dans les maladies humaines et à identifier de nouveaux gènes requis dans la formation du système auditif et éventuellement mutés dans les pathologies de type génétique, dans le but ultime d'améliorer le développement de nouvelles thérapies. Nos procédures expérimentales incluent plusieurs croisements de souris génétiquement modifiées et des prélèvements de tissus à différents âges embryonnaires, post-natales ou adultes après fixation du tissu cérébral par perfusion intracardiaque. Notre projet inclut également l'injection de nucléotides modifiés pour suivre la multiplication cellulaire *in vivo*, et des tests audiométriques pour tester les capacités auditives des différentes souches transgéniques de souris. Vu que ces gènes agissent principalement au cours du développement du système nerveux, et afin d'éviter une possible souffrance associée à leur absence chez les adultes, une grande partie de notre étude se limite à un stade péri- (P0) et postnatale (P8).

Nous utilisons des procédures expérimentales qui minimisent la douleur et la détresse des animaux. La qualité de la contention et la sûreté des gestes seront assurés par des utilisateurs compétents et formés, ce qui limitera le stress et la douleur imposés à l'animal par les procédures. Les procédures sont mises en œuvre en utilisant systématiquement des critères d'arrêt précoce et des points limites adaptés à chaque procédure et modèle génétique. Comme mesures de Raffinement de l'expérimentation, le bon état ou la souffrance des animaux seront observés selon des grilles d'évaluations adaptées aux procédures. Les procédures qui impliquent de la chirurgie sont mises en œuvre en utilisant systématiquement des traitements post-opératoires de type analgésique, tapis chauffant, et des critères d'arrêt précoce qui minimisent la douleur et la détresse des animaux. Le bon état ou la souffrance des animaux seront observés selon des grilles d'évaluations indiquées en Annexes. Les animaux seront hébergés dans les conditions habituelles d'animalerie avec un environnement enrichi en accord avec la réglementation en vigueur. Nous sélectionnerons par génotypage les souriceaux déficients pour *Hoxb1* à la naissance et réduirons la portée pour permettre aux souriceaux mutants plus faibles de bien de nourrir au près de la mère. En outre, au sevrage une nourriture énergétique et gélatinifiée sera ajoutée dans la cage pour optimiser la prise alimentaire. L'association des techniques d'études sur organes *ex vivo* nous permet de remplacer autant que possible les expériences sur animaux vivants (Remplacement). Dans un souci de Réduction, le nombre d'animaux pour chaque expérience sera limité à celui nécessaire à la validation d'un effet significatif. Nous utilisons une stratégie de croisement qui permet d'utiliser tous les animaux générés, et les mêmes animaux seront utilisés à la fois pour les études fonctionnelles, anatomiques et moléculaires. La sélection des animaux par génotypage des souriceaux permettra en outre de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'obtenir des données suffisantes pour répondre à nos questions scientifiques, sans compromettre le bien-être animal (Réduction). Nous optimisons chaque animal produit en prélevant du même animal le tronc cérébral et les cochlées. Pour ce projet nous utiliserons un nombre total de 2995 animaux (835 adultes, 720 P21, 1080 souriceaux à P8 et 360 souriceaux à P0).

11552 Les gliomes sont les tumeurs primaires du système nerveux central les plus fréquentes et représentent 80% des tumeurs malignes. En dépit des progrès réalisés dans la prise en charge des patients, ces tumeurs restent difficiles à traiter. Le glioblastome, forme la plus agressive des gliomes, est particulièrement résistant aux thérapies conventionnelles et en raison de sa nature hautement invasive, la résection chirurgicale complète est impossible entraînant une récurrence quasi inéluctable par la présence de cellules tumorales résiduelles. Une des avancées majeures du domaine de la recherche sur les glioblastomes est la mise en évidence dans ces tumeurs de sous populations présentant des caractéristiques de cellules souches neurales et appelées cellules souches de glioblastomes (CSG). Au cours des dix dernières années, de nombreuses études ont permis de montrer l'implication des CSG dans l'initiation et la progression tumorale ainsi que dans la résistance aux traitements, faisant de ces cellules une cible de choix pour le développement de thérapies ciblées et innovantes. Dans ce but, nous avons isolé et caractérisé des lignées de cellules

souches de glioblastomes (CSG) dérivées à partir de tumeurs de patients et qui constituent un outil essentiel pour l'étude des processus d'initiation et de progression tumoral ainsi que de la résistance aux traitements. Récemment, les facteurs YAP/TAZ/TEAD appartenant à la voie de signalisation ont émergé comme des déterminants majeurs de malignité dans de nombreux cancers où ils jouent un rôle essentiel dans la prolifération, l'invasion et la vascularisation. Cependant, ces facteurs sont rarement explorés dans les gliomes et une meilleure compréhension de leur implication pourrait permettre l'identification de nouveaux biomarqueurs prédictifs/pronostiques et de cibles thérapeutiques potentielles.

Ce projet de recherche a pour but de montrer d'une part la perte de capacité tumorigénique, d'invasion et de vascularisation des CSG après inhibition du facteur TEAD3 et d'autre part une potentielle acquisition de capacité tumorigénique par surexpression du facteur TEAD3 dans des cellules souches neurales normales. Le protocole complet nécessite l'utilisation de 42 souris « nude ». A la fin de chaque protocole nous ferons, d'une part, une étude de neuroanatomie associée à une étude par immunofluorescence (marqueurs souches et de différenciation).

La règle des 3R afin de remplacer, réduire et raffiner a été prise en considération. De nos jours, il n'est pas encore possible de modéliser un cerveau de mammifère *in vitro*, qui nous permettrait d'étudier la transplantation et donc de remplacer cette étude par des expériences *in vitro*. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique. Enfin, la notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation qui sont optimisées (sédation et analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales.

11553 La formation pratique obligatoire fait partie du programme de la formation pour le Diplôme Universitaire d'Expérimentation Animale : Niveau Concepteur, réalisée au sein de notre université et approuvée pour 5 ans. Les apprenants suivent des enseignements théoriques sur la formation réglementaire, l'éthique et les méthodes alternatives (maquette pédagogique du DU d'Expérimentation Animale Niveau Conception et réalisation de procédures, ex Niveau 1). Cependant, le recours à des méthodes alternatives est donc impossible pour l'apprentissage pratique de la manipulation des animaux à des fins scientifiques (remplacement). Ce projet fait partie de cette formation pratique dont les objectifs sont de former les apprenants (issus de l'enseignement supérieur ou du milieu professionnel) à mettre en pratique les connaissances théoriques relatives à la manipulation et la contention des animaux ainsi qu'à l'exécution des gestes expérimentaux de base chez le lapin. Tous les gestes techniques sont expliqués et réalisés préalablement par un enseignant-chercheur autorisé. Les apprenants réalisent les manipulations sous la surveillance de l'enseignant chercheur qui vérifie, le cas échéant, la bonne réalisation des procédures et le respect du bien-être animal pendant la réalisation des techniques de préhension et d'administration des substances par injection (raffinement).

Préalablement au stage pratique, les lapins seront acclimatés, habitués à la manipulation, sensibilisés à un allergène (deux injections à J0 et J14) pendant un mois et suivis chaque jour par les enseignants chercheurs en charge de la formation et le personnel technique compétent de la structure d'hébergement. Les lapins seront hébergés individuellement dans des batteries d'au moins 4200 cm², comprenant une plateforme, et du rondin végétal pour enrichissement (raffinement)

La formation des apprenants va concerner :

a) la mise en pratique de l'observation du comportement animal afin de reconnaître les signes comportementaux propres au lapin ;

b) l'apprentissage des gestes de base suivants réalisés sur le lapin :

-préhension, pesée, rasage partiel et administration d'un allergène et/ou de la solution physiologique diluante par injection intradermique.

-préhension, installation en système de contention, aérosol d'acide citrique de 0.05 à 1.6 mol/l, c'est à dire à des concentrations non toxiques mais susceptibles de déclencher un réflexe de toux et observation du réflexe.

L'état des lapins est surveillé chaque jour pendant la période de sensibilisation ainsi que pendant les procédures expérimentales. Les expériences préliminaires n'ont identifié aucune souffrance, détresse ou inconfort réel ou potentiel pendant la période de la sensibilisation préalable de 21 jours à l'allergène spécifique. Celui-ci, ne se trouvant pas dans l'environnement extérieur, l'exposition non contrôlée à cet allergène est impossible. Pendant la réalisation des tests intradermiques de contrôle de la sensibilisation au cours de nos projets scientifiques, nous n'avons observé aucune réaction allergique généralisée (réaction anaphylactique) et l'observation des animaux n'a pas montré de signes de souffrance, de détresse ou d'inconfort réel. Mais dans l'éventualité de la survenue de tels signes (diminution ou arrêt de consommation alimentaire ou de boisson sur 48h, perte de poids de plus de 10% en 3 jours, grattage ou blessure avec infection au niveau des sites d'injection, prostration, difficulté de déplacement, gênes respiratoires), les mesures mise en place seraient arrêtés des expériences, isolement, surveillance accentuée. Les animaux seraient euthanasiés en cas de persistance dans les 72 heures ou avant en cas d'aggravation brutale.

Afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés pour le projet (réduction) : a) les étudiants vont travailler en groupe de 5 maximum, encadré par un enseignant chercheur autorisé ; b) chaque groupe va utiliser 6 animaux maximum pour permettre à chaque participant de réaliser les gestes ; c) chaque animal sera utilisé par plusieurs groupes sur trois jours mais à 24 heures d'intervalle et pour des durées de 1 fois 2 heures et 2 fois une heure ; et d) chaque animal ne sera utilisé en tout et au maximum que dans 2 procédures légères le même jour. Les animaux seront suivis chaque jour pendant la semaine de formation durant laquelle les groupes de participants vont se succéder. Les animaux ne seront pas mis à mort à la fin du projet mais réutilisés dans un autre projet de recherche.

En se basant sur 2013-2015, entre 5 à 6 groupes de 5 apprenants seront accueillis chaque année, ce qui nécessite 8 lapins par an afin de permettre à chaque groupe de pouvoir réaliser les différentes procédures. Au total, pour la durée demandée de 5 ans, 40 animaux seront utilisés pour cette formation.

11554 Les maladies inflammatoires du colon comme la colite ulcéreuse ou la maladie de Crohn sont des maladies inflammatoires chroniques hétérogènes qui affectent plus de 1.3 millions patients aux Etats-unis et entre 2.5 et 3 millions en Europe. En France, l'incidence pour la maladie de Crohn est de 8.3 pour 100000 personnes avec une fréquence plus élevée chez des jeunes adultes entre 20 et 30 ans. Le coût pour le traitement et la prise en charge des patients atteint 4.6 à 5.6 billions euros/an.

Ces maladies inflammatoires résultent d'une activation inappropriée du système immunitaire (perte de la tolérance immunologique) qui attaque les cellules intestinales aboutissant à la destruction tissulaire dans une ou plusieurs zones du tube digestif, préférentiellement le côlon, l'intestin grêle et/ou l'anus. La qualité de vie des patients atteints de la maladie de Crohn est largement altérée avec une maladie qui évolue par poussées avec des alternances de phases de rémission. Lors des poussées, les patients souffrent de violentes douleurs abdominales associées à des diarrhées chroniques. Selon l'étendue des lésions inflammatoires, des formes hémorragiques sont observées. Parmi les causes de cette maladie, les facteurs immunologiques, génétiques et environnementaux ont été décrits.

Les traitements actuels permettent de réduire les signes cliniques en bloquant l'inflammation. Cependant, un nombre significatif de patients sont ou deviennent résistants à ces approches thérapeutiques, indiquant un réel besoin médical pour la découverte de nouvelles thérapies. La découverte des populations lymphocytaires T régulatrices (Treg) capable de contrôler les réponses immunitaires et de limiter le développement des maladies autoimmunes a permis d'initier de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'efficacité de certaines de ces nouvelles approches, qui consistent à faciliter la prolifération et la survie de ces Tregs ou à transférer des cellules T régulatrices ont été testée dans des modèles murins de colite. Dans ces modèles expérimentaux, il

a été montré que ces Treg étaient capables de réduire l'activité des cellules immunes et de diminuer l'inflammation et la destruction des muqueuses intestinales chez l'animal. Non seulement ces cellules régulatrices sont efficaces pour réduire l'inflammation, elles sont aussi capables de restaurer la tolérance immunologique.

Afin de rendre cette thérapie encore plus effective et innovante, nous avons modifié génétiquement les cellules T régulatrices afin qu'elles répondent de manière spécifique et ciblée aux antigènes responsables de l'activation inappropriée des cellules immunes inflammatoires. Ceci permet un ciblage local de leur activité immunorégulatrice réduisant ainsi leur toxicité potentielle et les risques d'immuno-suppression systémiques qui pourrait accroître le risque de maladies infectieuses des patients. Afin d'obtenir les données précliniques demandées par les autorités sanitaires pour les premiers tests chez l'humain, nous testerons cette nouvelle thérapie cellulaire dans deux modèles murins de colite. Le projet consiste donc à évaluer le bénéfice thérapeutique des Treg génétiquement modifiés ainsi que leur distribution et éventuelle toxicité dans un premier modèle qui récapitule les symptômes de la maladie de Crohn utilisant les souris génétiquement modifiées SCID ou Rag1ko et dans un second modèle qui récapitule les symptômes de la colite ulcéraire en utilisant des souris C57BL/6. Les règles d'expérimentation sont : (remplacer) : l'emploi des modèles *in vivo* est nécessaire au projet car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives permettant de reproduire *in vitro* la complexité des mécanismes immunologiques mis en place lors des maladies inflammatoires de l'intestin. (Raffinement) Les souris cohabiteront par groupe de cinq dans un environnement enrichi (respect des besoins d'enfouissement, d'échappement, de nidification). Un accès facilité à la nourriture et à l'eau est prévu (croquettes humidifiées et gel hydrique) dès l'apparition d'animaux affaiblis. En cas de souffrance de l'animal déterminée par la grille des points limites, l'animal sera euthanasié par des méthodes réglementaires. Pour les actes de prélèvement invasif comme les prélèvements sanguins, nous utiliserons un anesthésique local pour limiter la douleur. (Réduction) Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque groupe contiendra le nombre de souris minimum indispensable à l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Notre stratégie expérimentale est choisie pour réduire le nombre d'animaux malades en choisissant une souche de souris plus sensible comme la souche C57BL/6 pour le modèle de colite Ulcéraire. Un nombre total de 4092 souris sera nécessaire.

11555 OBJECTIF : L'infarctus du myocarde reste l'une des causes principales de décès chaque année. L'étude de sa physiopathologie et des mécanismes pouvant aboutir à la protection du tissu cardiaque, est donc une priorité afin d'obtenir des thérapeutiques efficaces pour réduire la taille de l'infarctus et donc ses répercussions. En effet plus la taille de l'infarctus sera grande, plus les complications et séquelles à long terme seront importantes. Notre unité travaille depuis de nombreuses années sur la compréhension des mécanismes visant à limiter la taille de l'infarctus. Nous étudions ainsi tous les phénomènes de cardioprotection, dont la compréhension permettrait l'utilisation d'outils pharmacologiques mimant ces phénomènes. Dans cette optique, nous avons développé un modèle murin d'ischémie-reperfusion cardiaque (mimant un infarctus du myocarde) qui nous permet de réaliser des études sur la taille de l'infarctus, ainsi que des études fonctionnelles, biochimiques et moléculaires sur cette pathologie.

Dans ce projet de recherche fondamentale, il est question d'évaluer l'effet des traitements administrés de manière conventionnelle lors de l'infarctus du myocarde en pratique courante, sur les lésions de reperfusion myocardique. En effet l'héparine, l'aspirine et les nouveaux anti-agrégants plaquettaires en dehors de leurs propriétés respectives anticoagulante et anti-agrégante ont des propriétés anti-inflammatoires qui potentiellement peuvent diminuer les lésions de reperfusion. Le développement de nouveaux traitements passe nécessairement par une évaluation des traitements actuels afin d'évaluer la possibilité de générer de nouvelles thérapeutiques. Ceci n'a jamais été testé *in vivo*. Compte tenu de la complexité des techniques et des délais d'analyses, l'étude devrait s'étaler sur 2 ans.

La ligature de l'artère interventriculaire antérieure est nécessaire au modèle et implique une chirurgie lourde, sous anesthésie générale. Dans le domaine de la recherche sur l'infarctus du myocarde, il s'agit du modèle de référence pour les études *in vivo*, notamment précliniques. La

chirurgie consiste à mettre l'animal sous respirateur artificielle, ouvrir le thorax afin de réaliser la séquence d'ischémie puis la reperfusion, effectuer les sutures et surveiller le réveil de l'animal. Néanmoins, cet acte chirurgical est parfaitement maîtrisé par les chirurgiens du laboratoire et fait l'objet d'une analgésie (systémique et locale) et d'un suivi post-opératoire adaptés. Selon les groupes d'étude considérés, le prélèvement (final) des tissus peut donc intervenir au plus tard 24h après la chirurgie.

Afin de mener à bien ces investigations qui prennent en considération l'effet d'un traitement sur l'ensemble de l'organe dans son environnement, le recours à l'expérimentation est obligatoire. Des tests statistiques ont été réalisés pour déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats analysables statistiquement pour cette étude (réduction). Ainsi, l'effectif ajusté au « minimum nécessaire » est de 126 souris C57bl/6J âgées de 8 à 14 semaines au moment de l'expérimentation, réparti sur les 3 années d'expérimentation. Dans le but d'améliorer le bien-être des animaux, et ce dès leur arrivée dans notre animalerie, un enrichissement de milieu est mis en place et renouvelé très régulièrement avant l'expérimentation ainsi qu'en soins post opératoires. Dans le but de supprimer la souffrance et la douleur, l'acte chirurgical est réalisé sous anesthésie générale avec prémédication analgésique et anesthésique local. En soins post opératoires, nourriture et boissons sous forme gélifiées seront mise à disposition de l'animal en plus de la nourriture et boisson habituelle, les groupes sociaux seront conservés et un protocole analgésique continu sera mis en place, le tout dans le but de limiter au maximum la souffrance potentielle de l'animal durant la phase post opératoire. Une fiche de suivi de chaque animal est complétée quotidiennement afin de surveiller le comportement et l'état de santé de l'animal pour ajuster les soins et l'analgésique ou encore mettre fin au protocole en accord avec le vétérinaire.

11556 La polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique (PIDC) est une pathologie inflammatoire auto-immune du système nerveux périphérique (SNP). Elle se caractérise par une réaction dirigée contre certaines protéines de la gaine de myéline et dont une démyélinisation des nerfs du SNP sur une période supérieure à 8 semaines. La PIDC se manifeste ainsi par des troubles moteurs (faiblesse musculaire à prédominance proximale) et sensitifs (engourdissements, paresthésies...) et peut évoluer selon un mode chronique, progressif ou rémittent-récurrent. Il s'agit d'une pathologie rare, avec une prévalence estimée à 1-7/100000 et peut survenir à tout âge mais débute préférentiellement entre 40 et 60 ans. Bien qu'il semble s'agir d'une maladie auto-immune à médiation essentiellement cellulaire, la pathogénèse précise impliquée dans la PIDC reste encore inconnue. Qui plus est, à l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif spécifique. En effet, les thérapies actuellement disponibles ne traitent que les symptômes de la maladie et les effets secondaires des certains de ces traitements limitent considérablement leur utilisation. C'est dans ce contexte qui s'inscrit notre projet de recherche, le but étant de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de cette maladie et de développer, tester et caractériser de nouvelles stratégies thérapeutiques. Pour ce faire, nous utiliserons un nouveau modèle animal fiable et reproductible mimant la PIDC humaine récemment développé au laboratoire appelé la Névrite Autoimmune Expérimentale chronique (NAEc). Ce modèle a été développé chez le rat par immunisation active avec un peptide issu de la protéine majeure de la myéline du SNP, à savoir, la protéine P0. Des tests électrophysiologiques, comportementaux et l'obtention de tissus à différents stades de la maladie sont nécessaires à l'élucidation des processus qui la sous-tendent. Pour cela, après prélèvement des tissus d'intérêt (cerveau, moelle épinière, queue de cheval, nerf sciatique, muscles, rate, ganglions, sang) nous utiliserons des techniques complémentaires de biologie moléculaire, de biochimie, d'immunologie et d'histologie. Ces études permettront d'identifier, développer et tester des cibles thérapeutiques plus adaptées et spécifiquement ciblées sur la PIDC ainsi qu'à la caractérisation de la réponse au traitement testé.

Dans ce projet, nous utiliserons au maximum 1194 rats sur 5 ans. La démarche expérimentale de ce projet s'inscrit ainsi dans le respect de la règle des 3R :

- Réduction : Nous avons réduit au minimum le nombre de rats nécessaire et suffisant par groupe pour préserver la puissance statistique. Afin de réduire le nombre d'animaux, à chaque fois que cela

sera possible, nous utiliserons le même animal pour étudier plusieurs paramètres (exemple : score clinique, test de motricité et prélèvement des tissus pour différentes techniques).

- Raffinement : Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et de détecter rapidement tout changement de comportement, des éventuels signes de douleur, de souffrance ou de stress s'ils devaient apparaître grâce à l'utilisation de points limites clairement définis. Ainsi, par exemple, au cas où des douleurs devraient apparaître, il est possible d'y remédier avec du Métacam donné par voie orale (dose de 1mg/kg).

- Remplacement : Les modèles de culture cellulaires *in vitro* ou les modèles *in silico*, ne permettent pas de modéliser de façon satisfaisante ni la complexité de la pathologie ni l'effet des traitements. De ce fait, il n'existe donc pas de méthode alternative, autre que des modèles animaux pour réaliser ces travaux.

11557 Ce projet de recherche fondamentale doit permettre de caractériser une population de cellules souches cutanées exprimant la protéine Wip1 et que nous nommerons « csWip1 ». Il s'agira de localiser ces cellules dans la peau et d'étudier leur contribution dans le maintien ou le rétablissement de son homéostasie après une lésion. De plus, une part de ce projet consistera à déterminer si les csWip1 constituent les cellules d'origine des 2 cancers cutanés majeurs, le SCC (Squamous cell carcinoma) et le BCC (Basal cell carcinoma). Ceux-ci sont en effet les cancers les plus répandus (>20% de tous les cancers) et, dans le cas du SCC, peuvent métastaser et sont associés à un mauvais pronostic (66% de mortalité dans les 5 ans, 52000 morts). Ils restent parmi les cancers les plus onéreux (en 1^{er} et 5^e positions en Australie et aux USA respectivement).

Il n'existe actuellement aucun consensus au sujet de la nature des cellules-souches de la peau : leur nombre, leur propriété et leurs localisations restent mystérieuses. Or, pour les étudier et démontrer leurs liens avec le développement tumoral, il est crucial de pouvoir les identifier. En effet, les cellules-souches sont les suspects les plus plausibles comme initiateur du développement cancéreux, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle évidente.

La protéine Wip1, a déjà été mis en évidence dans plusieurs populations de cellules souches, notamment au niveau du cerveau, de l'intestin et de la moelle osseuse. De plus, Wip1 est aussi associé aux cancers du sein, des ovaires, du cerveau et de l'intestin. Wip1 constitue donc un marqueur potentiel pour les cellules-souches cutanées, et les CsWip1 seraient à leur tour des candidats prometteurs dans la recherche des cellules-souches à l'origine des BCC et SCC.

Pour déterminer si les csWip1 sont les cellules d'origine des BCC et SCC, nous travaillerons avec des modèles murins transgéniques mutés pour 3 gènes parmi les plus fréquemment associés à ces pathologies : Smo, Kras et p53.

La mutation Smo provoque le développement de BCC tandis que la mutation Kras induit le SCC. Ces oncogènes seront exprimés dans les csWip1 seulement après injection de tamoxifène : leur expression est donc inductible et ces modèles murins ne pourront être qualifiés de "dommageables" qu'après injection de tamoxifène.

Ces mutations sur Smo et Kras seront associées à la délétion (KO) de p53. En effet, des mutations inhibant l'expression du gène p53 sont fréquemment associées aux BCC et SCC. Néanmoins, dans nos modèles murins, cette délétion est constitutive et ubiquitaire, à l'inverse de Smo et Kras. Les p53KO sont à phénotype dommageable car les souris homozygotes développent des tumeurs de façon spontanée à partir de 5 mois (lymphome et sarcome) mais 10-12 mois pour les hétérozygotes.

De ce fait, une stratégie de suivi de l'animal intégrant les 3Rs, est prévue pour limiter douleur, stress, angoisse pouvant être ressentie par les souris p53KO : Raffinement, remplacement, réduction.

-Raffinement : l'état de santé des animaux sera apprécié au moins 2 fois par semaine lors d'un examen approfondi avec recherche de symptôme clinique. Une grille d'observation a été construite afin de recenser les symptômes/dommages pouvant apparaître sur l'animal et de déterminer si l'état de santé de l'animal permet de continuer l'expérience ou doit être arrêté (points limites). Les gestes invasifs seront réduits au maximum et se limiteront soit à des injections de produit à des doses

n'induisant pas de douleurs, soit à une lésion limitée de la queue où une anesthésie adaptée sera utilisée.

-Remplacement : certaines expériences seront confirmées ou précédées par des cultures *in vitro* de cellules souches.

-Réduction : des efforts seront faits pour limiter le nombre de souris nécessaires par groupe, par exemple en utilisant les règles statistiques adéquates (méthode monte-carlo), en pratiquant des tests *in vitro* si possible et en créant des groupes de souris contrôles utilisables pour plusieurs expériences.

Cette étude nécessite l'emploi de maximums 852 souris sur 5 ans, incluant les animaux reproducteurs à phénotype dommageable (474) et des animaux expérimentaux (378 dont 216 à phénotype dommageable).

11558 L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de l'exposition à une hypoxie chronique associée à un traitement médicamenteux sur des lésions d'ischémie-reperfusion rénales chez le rat. Ce projet sera divisé en deux phases :

La première phase est une procédure pilote, qui consiste en la définition des conditions expérimentales et chirurgicales permettant l'observation de ces lésions sur le rein.

La deuxième phase consiste à exposer les animaux à une hypoxie chronique dans une chambre spécialement conçue afin de reproduire la vie à haute altitude, et d'y associer un traitement médicamenteux spécifique pour en observer les effets sur la récupération du rein.

Ces études font suite à des expérimentations sur des cultures cellulaires, dont les résultats préliminaires positifs ont encouragé la volonté de passer au niveau d'intégration supérieur (*in vivo*). Par ailleurs, ces lésions ne peuvent être observées que sur des animaux vivants et il n'existe à ce jour aucune méthode alternative. Le rat a été choisi car sa physiologie rénale est très proche de celle de l'homme et bien documentée dans la littérature. Ce modèle permet également d'avoir accès à des volumes satisfaisants de fluides biologiques (sang, urines) indispensables à l'analyse des nombreux marqueurs de notre étude. Le nombre de rats total utilisé a été défini en s'appuyant sur des tests statistiques et sera de 72.

Après une semaine d'acclimatation et de sociabilisation (par des manipulations douces et répétées), les rats évolueront dans leur environnement habituel, c'est-à-dire une grande cage pourvue d'une litière de copeaux en couche épaisse (permettant l'enfouissement de l'animal) enrichie de boîtes d'œufs en carton et/ou d'une plateforme en plastique. La cage sera placée dans la chambre d'hypoxie (caisson vitré permettant l'observation constante des animaux) et le traitement sera administré une fois par jour par gavage. Pour la procédure chirurgicale, les rats seront placés sous anesthésie gazeuse et sous analgésie et un prélèvement sanguin de faible volume sera réalisé sur la veine caudale en fin de chirurgie. A l'issue de la chirurgie, les rats seront replacés dans leur cage, en groupe, et des dispositions particulières seront prises (telles que l'ajout de coton pour lutter contre l'hypothermie pendant la phase de réveil). Ils seront observés en continu pendant trois jours et leur état sera évalué grâce à une grille de douleur adaptée (basée sur l'échelle de Morton et Griffith). A la fin du protocole, les rats seront euthanasiés après anesthésie gazeuse et les différents prélèvements biologiques seront recueillis pour analyses ultérieures.

11559 Les mastocytoses systémiques (MS) sont des cancers du sang, le plus souvent retrouvées chez l'adulte (prévalence mondiale de 1/20000 à 1/40000). L'accumulation pathologique de mastocytes anormaux (cellules du système immunitaire impliquées dans les réactions allergiques) observée dans différents organes et/ou tissus de ces patients entraîne des anémies, des atteintes cutanées, des atteintes du système digestif et/ou hépatique plus ou moins sévères. Ces MS sont très hétérogènes avec une incidence variable sur la qualité et l'espérance de vie des patients. A l'heure actuelle, les thérapies utilisées sont nombreuses mais avec des efficacités très variables.

Nos travaux réalisés *in vitro* sur des cellules tumorales de patients ont permis de mettre en évidence l'existence d'une nouvelle cible thérapeutique, à considérer dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement de MS. Un brevet a été déposé dans ce sens et comme

prérequis à un essai clinique, nous souhaitons valider l'efficacité de ces molécules sur un modèle animal de MS. Les molécules que nous souhaitons utiliser seront testées seules ou en combinaison avec des traitements déjà utilisés dans cette pathologie.

Pour mener à bien ce projet, nous allons mettre en place un modèle murin développant une MS humaine, modèle expérimental se rapprochant le plus de la pathologie humaine. Pour cela, des souris dépourvues de système immunitaire, afin d'éviter tout rejet de greffe, vont recevoir par voie intraveineuse une injection d'une lignée tumorale de MS humaine. Dans un second temps, ces souris recevront ou non, par voie orale (gavage avec une sonde souple, 5 jours par semaine pendant 6 semaines ; le début du traitement débutant 5 ou 8 semaines après l'injection des cellules tumorales), les molécules thérapeutiques à tester. La croissance tumorale et l'efficacité des stratégies thérapeutiques utilisées seront suivies par imagerie du petit animal *in vivo* (imagerie toutes les 3 semaines sur souris anesthésiées) ou par suivi de la présence des cellules tumorales dans le sang de manière hebdomadaire.

En accord avec la règle des 3R, nous avons réalisé le maximum d'expériences *in vitro* afin de valider l'efficacité de nos molécules thérapeutiques, seules ou en combinaison. Néanmoins, il est nécessaire de vérifier ces résultats dans un modèle *in vivo* intégrant la plupart des caractéristiques de la pathologie humaine telles que l'hétérogénéité des cellules tumorales, l'existence de tissus sains, la présence de barrières limitant l'efficacité des traitements. Nous avons réduit le nombre de souris utilisés au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 960 souris, sur une durée de 3 ans. Nous prévoyons de réaliser 8 séries de 120 souris, chaque série permettant de tester les différentes molécules thérapeutiques seules ou en association, avant (5 semaines post-injection des cellules tumorales) ou après l'établissement de la maladie (8 semaines post-injection des cellules tumorales).

Une attention toute particulière sera portée au bien-être des animaux par une surveillance journalière assurée par le personnel de l'animalerie et les expérimentateurs. Nous veillerons, par ailleurs, à réduire au minimum l'intensité et la durée des souffrances ressenties par les animaux, en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence physique, le poids et le comportement des animaux. Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt qui lorsqu'ils sont atteints conduisent à l'euthanasie de la souris. Le suivi des souris en expérimentation se fera sur une période maximale de 30 semaines après l'injection des cellules tumorales, à l'issue de laquelle tous les animaux seront euthanasiés.

11560 La dépression est une maladie psychiatrique qui touche tous les âges. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, cette maladie affecterait 350 millions de personnes dans le monde. Ce trouble mental peut être diagnostiqué grâce à de nombreux symptômes : une tristesse quasi-permanente, une perte d'intérêt et de plaisir ainsi que des troubles du sommeil et une forte fatigue, responsables de difficultés attentionnelles, de concentration et de mémorisation. D'un point de vue physiopathologique, différents mécanismes semblent impliqués. Ainsi, une hyperactivité du système de réponse au stress et des anomalies des neurones de l'hippocampe (région du cerveau impliquée dans la mémoire et les émotions) sont souvent observés chez les patients sévèrement déprimés. Ces deux phénomènes sont d'ailleurs vraisemblablement liés : l'altération de la réponse au stress conduit à une sécrétion anormalement élevée de cortisol (l'hormone du stress) qui est potentiellement neurotoxique et peut entraîner une désorganisation, voire une dégénérescence neuronale dans l'hippocampe. L'augmentation de la sécrétion de cortisol entraîne en effet une diminution de la production de facteurs essentiels à l'activité et la survie des neurones.

Les médicaments antidépresseurs ciblent en général les neurones à sérotonine et noradrénaline. Ces médicaments doivent être pris régulièrement pendant plusieurs semaines pour voir apparaître les premiers signes bénéfiques chez l'Homme. De plus, outre ce délai d'action important l'efficacité des antidépresseurs est variable et environ 30% des patients sont totalement résistants au traitement. Dans ce contexte, les modèles animaux de dépression sont indispensables pour évaluer l'efficacité de nouvelles approches thérapeutiques. Dans un de ces modèles, l'exposition répétée de souris à la corticostérone (équivalent chez le rongeur du cortisol humain) dans l'eau de boisson

ou en « pellet » sous-cutané entraîne des modifications comportementales et neurochimiques qui rappellent les caractéristiques détectées chez les patients dépressifs. Notre travail au laboratoire consiste ainsi à utiliser le modèle de souris exposées à la corticostérone pour tester les effets de différentes stratégies thérapeutiques : génétiques, pharmacologiques ou environnementales. Ce travail fait intervenir différents acteurs : l'industrie pharmaceutique qui fournit au laboratoire de nouvelles molécules à tester ou des laboratoires académiques avec qui nous collaborons pour évaluer des stratégies génétiques ou environnementales, dont la pertinence repose sur nos propres découvertes.

Dans ce projet, les expériences seront réalisées chez la souris qui est l'espèce pour laquelle l'exposition à la corticostérone, comme modèle de dépression chez le rongeur, a été validée. Les animaux seront donc, dans un premier temps, exposés à la corticostérone dans l'eau de boisson ou en pellets sous-cutanés selon des procédures publiées puis traités avec différentes stratégies (traitement curatif). Dans certaines procédures, les stratégies thérapeutiques pourront précéder l'exposition à la corticostérone (traitement préventif). A l'issue de ces protocoles, on évaluera le phénotype comportemental des animaux et notamment la capacité des interventions pharmacologiques et non-pharmacologiques à produire des effets de type antidépresseur chez la souris. A l'issue de cette phase, les animaux seront séparés en différents groupes afin de préciser le mécanisme d'action des différentes interventions. En particulier, nous mesurerons l'activité électrique des neurones sérotoninergiques et la libération de ce neurotransmetteur dans l'hippocampe, une région cérébrale fortement impliquée dans la dépression.

La réalisation de ce projet nécessitera au maximum l'utilisation de 780 animaux sur une période de 5 ans afin de tester différentes stratégies thérapeutiques et d'effectuer l'ensemble des contrôles permettant de garantir la validité des résultats. Le nombre de groupes expérimentaux a été défini de façon à limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Cependant il est important, afin d'assurer la validité des conclusions de l'étude, d'avoir des contrôles négatifs (souris non exposées à la corticostérone) et de comparer les effets de nouveaux traitements à des traitements validés déjà commercialisés (contrôles positifs). Dans l'objectif de diminuer le nombre d'animaux, ceux-ci pourront être soumis à plusieurs tests comportementaux, en veillant toutefois à ce que l'accumulation des tests ne constitue pas une source de détresse. Le nombre choisi de souris par groupe représente l'effectif minimal nécessaire pour obtenir une puissance statistique suffisante pour les comparaisons de plusieurs groupes (ANOVA à un facteur) dans les tests comportementaux ou neurochimiques. Tous les animaux sont hébergés selon les normes d'éthique en vigueur et disposent d'enrichissement lors de la stabulation. Afin d'assurer un suivi optimal du bien être animal, notamment ceux subissant une chirurgie, une surveillance jusqu'au réveil puis quotidiennement sera effectuée de manière à identifier d'éventuels signes d'infection ou de douleur (hyperactivité puis isolement et indifférence par rapport au milieu extérieur, diminution du comportement exploratoire, attitude prostrée avec dos voûté, expression faciale modifiée, fuite ou défense à la manipulation, vocalises). Les animaux présentant de tels symptômes seront euthanasiés. Ces études pré-cliniques devraient permettre de mettre en évidence l'efficacité de nouveaux traitements antidépresseurs et de proposer de nouvelles pistes de recherches cliniques pour nos collaborateurs industriels ou académiques, notamment dans le milieu hospitalo-universitaire.

11561 Depuis de nombreuses années, les caractères de production (croissance, nombre d'œufs, efficacité alimentaire.) ont été considérablement améliorés chez la poule pondeuse grâce à la sélection génétique ainsi qu'à l'amélioration de la qualité de l'aliment, des conditions d'élevage et de la prophylaxie. L'amélioration des performances semble avoir affaibli les fonctions immunitaires en raison d'un équilibre d'allocation métabolique compromis entre la production et la réponse immunitaire. A l'inverse, nous ne savons pas si l'amélioration de la réponse immunitaire des animaux peut avoir un impact négatif sur la croissance et la production des animaux.

L'objectif du projet est de comparer les taux de synthèse des protéines du plasma, du muscle et de l'œuf, entre deux lignées de poules : 1) une lignée sélectionnée pour une production d'anticorps importante (lignée ND3), 2) une lignée témoin issue de la même population d'origine que la lignée ND3, mais conservée sans sélection. L'analyse de production protéique sera effectuée par

marquage protéique en utilisant l'eau lourde (oxyde de deutérium D2O, non radioactive), administrée par voie orale. Cette approche est plus facile à mettre en œuvre et moins invasive que la méthode conventionnelle (injection intraveineuse). Le projet utilisera un total de 144 animaux.

Respect de la règle des 3R :

- Remplacer : Pour évaluer le lien entre immunité et digestion, il faut disposer des mesures sur les animaux et le modèle le plus adapté pour l'évaluer sur le poulet est le poulet lui-même
- Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette expérience a été déterminé suite à des calculs statistiques.
- Raffiner : Les poussins sont élevés en parquets collectifs, avec des enrichissements du type ficelles, balles en plastique, bloc à piquer. Ils seront visités 2 fois par jour et toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans le point limite entraînera la mise à mort des animaux par le personnel qualifié

11562 Il a été démontré et publié que, en cancérologie, plus de 45% des candidats médicaments testés favorablement pour leur efficacité chez les rongeurs, par les méthodes classiques, donnent des résultats décevants chez l'Homme, dès la phase I des essais cliniques.

L'utilisation de modèles de tumeurs humaines greffées sur souris ou PDX pour Patient Derived tumor Xenografts permet de réaliser des études de pharmacologie expérimentale plus prédictives de la réponse en clinique chez l'Homme que les autres modèles précliniques utilisés en oncologie. Ces modèles développés au cours des dernières années sont donc des souris porteuses d'une tumeur humaine. Ce sont actuellement les seuls qui permettent de reconstituer sur animal la complexité des tumeurs humaines. Notre expertise offre aux développeurs de médicaments un accès à des modèles innovants de cancers permettant d'obtenir des données fiables et reproductibles en complément des données générées en interne ou obtenues sur d'autres modèles précliniques en vue des études cliniques ultérieures.

Chaque étude de pharmacologie expérimentale sur PDX, impose de disposer d'animaux donneurs de tumeurs. La qualité de ces tumeurs et des fragments (ou greffons) qui en sont extraits a un impact important sur la qualité de l'étude de pharmacologie expérimentale ainsi que sur la quantité d'animaux nécessaire.

L'objectif de ce projet est de décongeler et entretenir des modèles de PDX en vue de leur utilisation dans des études de pharmacologie expérimentale.

Les modèles de tumeurs développés peuvent être congelés sous forme dite « revivifiable » afin d'éviter de devoir les maintenir au cours du temps sur animaux et ainsi réduire l'utilisation d'animaux au minimum.

La planification d'une étude nécessite la décongélation du modèle sélectionné pour sa réalisation et sa greffe sur des animaux receveurs. Le nombre d'animaux nécessaire est réduit au minimum nécessaire grâce à une planification rigoureuse des décongélations des PDX.

Le nombre d'animaux utilisé à cette étape est strictement adapté, modèle par modèle afin d'obtenir au minimum 2 tumeurs en croissance après la décongélation. L'ensemble des données historiques recueillies sur de nombreuses années ainsi que la connaissance de nos modèles nous permettent d'anticiper le nombre d'animaux nécessaire à utiliser. Le taux de prise de greffe à cette étape de décongélation est en général inférieur au taux de prise de greffe observé lors d'une greffe à partir d'une tumeur juste décongelée et défini lors du développement du modèle.

Les fragments de tumeurs extraits de ces animaux seront utilisés pour amplifier le modèle sur de nouveaux animaux receveurs. Le nombre d'animaux utilisé sera de nouveau strictement adapté, modèle par modèle, afin d'obtenir le nombre de tumeurs palpables et en croissance nécessaire à la réalisation de l'étude planifiée.

Pour résumer 2 étapes sont nécessaires à l'obtention de greffons de qualité en vue d'une étude de pharmacologie expérimentale :

Une première phase de décongélation-croissance tumorale.

Une deuxième phase d'amplification-croissance tumorale qui permettra d'obtenir le bon nombre de fragments de qualité.

Concernant la règle des 3Rs,

Remplacement : Il n'est pas possible de faire pousser *in vitro* des modèles de PDX. Tout passage en culture cellulaire d'un modèle de PDX peut donner lieu à une dérive génétique rapide conduisant à une perte de ses caractéristiques génétiques et conduirait à réaliser des études de pharmacologie expérimentale sur des modèles non maîtrisés et dont les résultats ne seraient plus transposables en recherche clinique. A ce jour, l'utilisation de l'animal ne peut pas être Remplacée.

Réduction : La planification anticipée des études sur 6 mois permet d'avoir à chaque instant, au sein de la collection complète, la liste précise des modèles qui doivent être décongelés et de réduire au nombre strictement nécessaire les décongelations. En l'absence de besoin en étude pharmacologie expérimentale, les modèles restent congelés sous forme « revivifiable ».

Raffinement : Les conditions d'hébergement et d'enrichissement appliquées permettent de réduire au maximum l'hétérogénéité de croissance ainsi que tout facteur pouvant perturber la croissance des modèles entre les animaux et donc obtenir le nombre nécessaire d'échantillons de qualité optimale en fin de projet.

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

Le projet de maintien des modèles de xénogreffes nécessitera au maximum 4992 animaux sur 2 ans.

11563 Le cancer du pancréas est un cancer très meurtrier qui résiste aux thérapies actuelles. La communauté internationale travaille à mieux connaître son fonctionnement pour développer de nouvelles stratégies d'attaque de ce cancer, en étroite synergie avec les oncologues. Un domaine encore peu exploré dans le cancer du pancréas est l'étude du métabolisme énergétique alors que les cellules tumorales sont très gourmandes en énergie qui soutient leur prolifération anarchique. Cette énergie provient essentiellement des mitochondries, appelées « chaudières » des cellules. Ce projet vise à mettre en lumière l'impact des mitochondries dans la résistance thérapeutique des patients, en vue de l'utilisation de ces connaissances pour améliorer la prise en charge des patients. Des résultats préliminaires obtenus *in vitro* sur cellules tumorales pancréatiques issues de patients en culture montrent un rôle protecteur des mitochondries contre la chimiothérapie. Des essais précliniques innovants combinant chimiothérapie et inhibition des mitochondries permettront de définir une signature moléculaire prédictive de la réponse à cette poly-chimiothérapie. Ce projet est innovant pour deux raisons principales : (1) il vise à explorer le rôle des mitochondries dans la résistance thérapeutique du cancer du pancréas qui reste très peu connu, et (2) il s'appuie sur notre biobanque locale de cellules tumorales pancréatiques issues de patients qui est unique au monde. Ainsi la signature moléculaire qui découlera de ce projet sera totalement inédite. L'ambition est qu'elle soit à terme utile aux cliniciens pour une meilleure prise en charge des patients atteints de cancer de pancréas qui reste très déprimante à ce jour.

Le projet préclinique impliquera des procédures utilisant des souris en respectant la règle des 3R. Dans le respect des principes de remplacement et de réduction, nous testons actuellement *in vitro* (cellules tumorales dérivées de patients en culture) 10 patients dont les cellules présentent un métabolisme mitochondrial différent, 5 drogues utilisées en chimiothérapie (gemcitabine, 5-FU, irinotecan, oxaliplatine, paclitaxel) seules ou en combinaison avec un agent ciblant une fonction mitochondriale (6 molécules déjà utilisées en clinique sont en cours d'évaluation). L'identification *in vitro* des combinaisons de molécules permettant d'abolir la résistance des cellules à la mort induite n'est pas suffisante, et elle doit être complétée par des études *in vivo* pour assurer un intérêt réel

vers le transfert de ces recherches en clinique. Le modèle animal le plus pertinent à ce jour reste la souris.

Deux procédures seront mises en œuvre. La première visera à tester la réponse de cellules de patients xéno greffées en sous-cutané dans des souris nude à la chimiothérapie standard avec ou non le ciblage concomitant des mitochondries. Dans le respect du principe de réduction du nombre d'animaux, sur la base des expériences *in vitro* ayant permis de déterminer les molécules les plus efficaces, cette étude *in vivo* impliquera 3 patients de capacités énergétiques mitochondriales différentes, 4 molécules de chimiothérapie et 4 molécules ciblant le métabolisme mitochondrial. Cette procédure utilisera 1920 souris. La seconde procédure visera à cibler le rôle des mitochondries dans la résistance aux chimiothérapies standard et la rechute des patients, dans un contexte expérimental qui se rapproche de très près de la physiopathologie humaine, à savoir des tumeurs se développant dans le pancréas et pourvues de leur microenvironnement naturel constitué notamment de cellules immunitaires antitumorales qui sont impliquées dans la réponse à la chimiothérapie. Nous réaliserons pour ce faire des greffes syngéniques ou « allogreffes » (cellules tumorales pancréatiques de souris C57BL/6 greffées dans des souris receveuses C57BL/6) en orthotopique (dans le pancréas). Nous disposons de cellules qui n'ont pas besoin d'être implantées par chirurgie, en effet une simple injection en intrapéritonéal suffit pour une bonne invasion du pancréas assurant le développement tumoral. Le caractère fortement invasif de la chirurgie sera ainsi évité ce qui favorisera le bien-être de l'animal, contribuant au respect du principe de raffinement des procédures expérimentales. L'expression de la luciférase dans ces cellules permettra le suivi du développement tumoral par imagerie en temps réel. Dans le respect du principe de réduction du nombre d'animaux, sur la base des expériences *in vitro* ayant permis de déterminer les molécules les plus efficaces, cette étude *in vivo* impliquera 2 lignées différentes de cellules tumorales pancréatiques de souris, 3 molécules de chimiothérapie et 3 molécules ciblant le métabolisme mitochondrial. Cette procédure utilisera 1260 souris.

Pour les deux procédures, dans le respect du principe de raffinement, les implantations de cellules tumorales seront réalisées sur animal anesthésié et les souris seront surveillées au quotidien pour détecter le moindre signe de souffrance. Si l'état de la souris nécessite une prise d'antalgique, nous lui donnerons de la buprénorphine à 0,1mg/Kg. Tout animal ayant atteint le point limite sera sacrifié. De plus, les conditions d'élevage seront optimisées pour réduire le stress des animaux au minimum (présence de rouleaux de papier dans les cages pour se blottir, constitution de petits groupes sociaux afin d'éviter le stress de l'isolement, maximum de 6 souris par cage). L'ensemble de ces mesures conduira à favoriser au maximum le bien-être des souris.

Nous estimons à 3180 le nombre d'animaux impliqués dans ce projet.

11564 L'objectif du projet est d'évaluer les thérapies anticancéreuses en recherche préclinique dans des modèles rongeurs. Ce projet inclus un large panel de modèles *in vivo* adaptés pour des études de pharmacocinétique, de pharmacologie, d'évaluation de l'efficacité des composés thérapeutiques et pour la recherche translationnelle dans le domaine de l'oncologie.

L'objectif de ce projet de recherche est de développer de nouveaux modèles expérimentaux de cancer le plus prédictifs possible afin de mimer les pathologies humaines et de tester sur ces modèles de nouvelles thérapies anticancéreuses. Dans les procédures réalisées sur les modèles des cancers animaux, les composés seront évalués dans un environnement physiologique. Cependant, les résultats de ces études ne sont pas toujours transposables à l'homme.

Pour cette raison, nous avons aussi développé sur les souris et des rats immunodéficients des modèles de xéno greffe de cellules cancéreuses ou des fragments de cancers obtenus à partir des patients. Ces modèles permettent de mieux évaluer l'efficacité des molécules destinées à traiter les cancers chez l'homme. Les animaux immunodéficients sont hébergés dans des conditions d'hygiène stricte afin qu'ils ne souffrent pas de leur statut immunitaire.

Dans certains cas l'efficacité en immuno-oncologie des composés antitumoraux peut être réalisés sur des tumeurs humaines greffées sur des animaux humanisés. Dans ce cas, Certaines populations cellulaires, telles que les cellules du système immunitaire des souris, seront remplacées

par celles de l'homme provenant soit d'un patient soit d'un donneur sain. Les résultats de ces études sont très proche de la réponse chez l'homme. Dans ces modèles, une maladie du greffon contre l'hôte peut se développer, les souris seront euthanasiées lorsque les signes cliniques notables ou sévères seront atteints.

Chaque type de tumeur a des caractéristiques bien distinctes et une thérapie fonctionnant sur une tumeur ne fonctionne pas sur toutes les tumeurs. Certains modèles tumoraux humains n'ont pas de modèles équivalents chez l'animal. C'est pourquoi nous développons des nouveaux modèles (ex : nouvelle lignée tumorale). La première étude réalisée avec un modèle sera une étude pilote durant laquelle, les experts (dont le vétérinaire) analyseront les conséquences des procédures sur le bien-être des animaux, la validité des résultats scientifiques obtenus, et ils détermineront les points limites spécifiques les mieux adaptés ainsi que la stratégie du suivi clinique.

Des cellules ou des fragments cancéreux seront greffés en sous-cutanée, ou directement dans un tissu cible de la tumeur pour mieux simuler l'environnement originel du cancer. Cette greffe peut nécessiter une chirurgie qui se fera sous anesthésie et avec une analgésie appropriée. Des soins pré et post opératoire seront effectués et un vétérinaire est disponible si besoin. Les animaux seront ensuite traités avec de nouvelles thérapies anti-cancéreuses. Des thérapies innovantes à base de bactérie ou virus peuvent être administrées, lorsqu'un tel cas se présente une évaluation des risques pour les animaux et les manipulateurs est réalisée.

Lorsque le traitement et/ou la tumeur sont susceptibles d'engendrer une douleur ou un inconfort une analgésie ou des soins spécifiques seront apportés aux animaux. Les animaux seront suivis individuellement et ils seront euthanasiés aux points limites définis dans chaque procédure.

Dans le but d'avoir des résultats les plus fiables possibles, ce projet répond au maximum aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

1) Remplacement : Pour étudier l'efficacité d'une thérapie, le recours à l'animal est indispensable pour la prise en compte de l'environnement tumoral dans le développement de la tumeur dans un organisme vivant. De plus aucun modèle alternatif n'existe pour mimer les concentrations plasmatiques et tissulaires à la suite d'une administration de substance.

2) Réduction : nous utiliserons un nombre réduit d'animaux mais suffisant pour mettre en évidence des différences significatives selon notre expérience des modèles en oncologie et dans nos conditions expérimentales. Pendant cinq années de ce projet nous allons utiliser 3000 animaux soit 2400 souris et 600 rats. Ce nombre d'animaux permet en moyenne de réaliser 42 études par an. D'autre part, pour réduire le nombre d'animaux utilisés, dans ces procédures nous allons utiliser des biomarqueurs et des techniques faiblement invasives d'imagerie chez le petit animal.

3) Raffinement : Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Dans l'objectif de raffinement, toutes les procédures techniques sur les animaux seront réalisées selon les standards validés par la structure chargée de bien-être animal (fréquence de prélèvements de sang, les méthodes d'administration des composés, ...). Lorsque le modèle animal inclut une phase de chirurgie, celle-ci est réalisée sous anesthésie générale, avec une analgésie appropriée et l'animal est suivi régulièrement. En cas de souffrance des points limites sont définis pour mettre un terme à celles-ci.

11565 Staphylococcus aureus est une bactérie de la flore commensale pouvant être responsables d'infections nosocomiales et d'infections communautaires.

Le traitement des infections à Staphylococcus aureus reste problématique et il n'existe pas de consensus à l'heure actuelle sur le choix de l'antibiothérapie la plus efficace. L'émergence de la résistance à la méticilline chez les souches de S. aureus et la production de toxines par certains d'entre eux, augmentant la virulence de la bactérie, complique la prise en charge des patients.

Face à cette augmentation continue des résistances bactériennes, il apparaît donc indispensable d'évaluer de nouvelles approches thérapeutiques.

Le but de notre travail est d'évaluer l'activité de deux nouvelles molécules à activité anti bactérienne dans deux modèles murins expérimentaux (péritonite et infection de cuisse).

Deux souches bactériennes seront évaluées dans ce projet :

- 1 souche de *S. aureus* sensible à la méticilline
- 1 souche de *S. aureus* résistant à la méticilline

Au cours de ce projet, 352 souris Swiss femelles vont être utilisées.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'activité d'un composé sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*).

Réduction.

Les premiers temps de l'expérimentation consistent à la validation du modèle avec les souches à étudier, ce qui permet d'utiliser le moins d'animaux possible lors de l'évaluation thérapeutique proprement dite.

Pour les évaluations thérapeutiques, le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable.

Raffinement.

- Avant l'expérimentation :

o Conditions d'hébergement : Acclimatation des animaux durant une semaine avant l'expérimentation. Assurance d'une non surpopulation dans la salle d'hébergement. Les animaux sont conservés dans des cages répondant aux dernières normes. La litière est changée 1 fois par semaine avec accès libre à l'eau et à la nourriture (alimentation spécifique pour rongeur).

o Détermination des points limites : cf annexe 1, figure 5

- Pendant l'expérimentation :

o Soins pré et post intervention : Les souris reçoivent une injection sous cutanée de buprénorphine 30minutes avant l'infection puis 2 fois par jour pendant 24h ou 48h (en fonction des modèles). Après cette phase, les animaux sont observés bi quotidiennement, pesés une fois par jour et en cas d'apparition de symptômes de douleurs, le traitement sera prolongé. Sinon, arrêt de la buprénorphine et de la pesée.

o Le modèle d'infection de cuisse est réalisé sous anesthésie générale

o Application des points limites (cf raffinement avant expérimentation)

o Euthanasie par dislocation cervicale après pré-anesthésie

Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long de l'étude.

11566 Le sepsis, état pathologique lié à une réaction inflammatoire systémique suite à une infection, est la première cause de mortalité dans les unités de réanimation médicale et de soins hospitaliers. Parmi les effets observés, l'inflammation et un stress oxydant peuvent être mentionnés, contribuant à une aggravation de la pathologie et/ou un retard dans la récupération ainsi que dégradation structurale et fonctionnelle de plusieurs organes pouvant amener à la mort. Ces altérations seraient induites, entre autres, par des cytokines pro-inflammatoires et des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Il apparaît pertinent de rechercher et tester des composés limitant le stress oxydant et l'inflammation. Dans le cadre de ce travail, deux pistes sont envisagées. D'une part, celle du sélénium, un oligoélément essentiel dont le déficit induit l'altération de fonctions physiologiques. Il intervient en effet en améliorant l'activité d'enzymes antioxydantes. Il a également été démontré que plus de 90% des patients septiques étaient atteints de carence en sélénium. D'autre part, la spiruline, cyanobactérie riche en protéines, phycocyanine, fer, vitamines et oméga-6 possède également des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. Elle peut, en outre, être un vecteur de sélénium. La spiruline sélénée est couramment utilisée en tant que complément alimentaire sous forme liquide. Nous souhaiterions donc tester les effets d'une supplémentation en sélénite de sodium (40µg/kg de poids corporel), spiruline (1000 mg/kg de poids corporel) et spiruline enrichie en sélénium (1000 mg/kg de poids corporel, à 350 µg de sélénium par gramme de spiruline pour

obtenir, à la fin, des concentrations en sélénium équivalente à celle du sélénite de sodium soit 40 µg/kg de poids corporel) sur le stress oxydant et l'inflammation chez des rats septiques.

Ce projet a une durée de 12 semaines. Il impliquera l'utilisation de 96 rats Wistar qui seront tous carencés en sélénium pendant 8 semaines puis répartis en 4 groupes en fonction de la supplémentation (contrôle, sélénite de sodium, spiruline et spiruline enrichie en sélénium). La supplémentation sera réalisée pendant 4 semaines. Chaque groupe sera constitué de 24 animaux. A la fin de la supplémentation, 8 animaux subiront une induction du sepsis par CLP (ligature et perforation du caecum), 8 seront des shams (laparotomie sans induction du sepsis), 8 serviront de contrôle afin d'évaluer uniquement les effets de la carence et des supplémentations.

Les expérimentations seront réalisées dans le respect de la règle des 3R :

- il s'agit d'une étude des effets au niveau de l'organisme pour laquelle le remplacement n'est pas possible.
- le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum permettant une étude statistique cohérente, et en accord avec le principe de réduction.
- Le raffinement est respecté au niveau des conditions d'hébergement des animaux et au niveau des procédures d'anesthésie/Analgésie.

11567 En France, la maladie d'Alzheimer (MA) et les maladies apparentées, touchent environ 900 000 personnes et altèrent de façon significative la qualité de vie et l'autonomie des personnes atteintes et de leurs familles. Avec le vieillissement de la population et le manque de résultats significatifs des traitements médicamenteux, les maladies neurodégénératives sont devenues un enjeu prioritaire de santé publique. Les défis actuels se focalisent notamment sur une meilleure efficacité des médicaments en ciblant d'une façon précise le cerveau. De nombreuses stratégies thérapeutiques ont été explorées depuis quelques décennies. Plusieurs obstacles relatifs à la modification de la membrane neuronale avec l'âge et le passage de la barrière hémato-encéphalique rendent difficile l'administration des médicaments dans le système nerveux central. Dans ce contexte, un nombre croissant d'études montre que l'utilisation de nanoliposomes, composés de bicouches lipidiques, pourrait représenter des vecteurs de molécules capables de cibler le cerveau. Les nanoliposomes sont de petites vésicules sphériques de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres de diamètre, composés de bicouches lipidiques. Ils possèdent un potentiel neuroprotecteur propre grâce à leur richesse en acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) dont l'importance pour la fonctionnalité neuronale est largement décrite dans la littérature. Nous avons notamment montré que les AGPI n-3 permettait de restaurer l'efficacité d'une cible thérapeutique anti-Alzheimer chez la souris âgée, suggérant que leur co-administration avec des molécules actives puissent améliorer leur potentiel thérapeutique.

L'objectif de ce projet est d'analyser la biodisponibilité d'acides gras, sous forme de nanoliposomes, après administration par gavage chez la souris, afin de valider, dans un second temps, leur potentiel neuroprotecteur. La dose de nanoliposomes administrée sera validée *in vitro* sur culture primaire de neurones corticaux, grâce à des études de neuroprotection contre la toxicité du peptide Abeta sur les neurones, l'agent précocément impliqué dans la maladie d'Alzheimer (remplacement). La biodisponibilité périphérique et cérébrale après administration par voie orale, ne pourra ensuite être validé que sur un modèle animal. Nous avons donc retenu notre modèle d'étude habituel, le modèle murin pour sa pertinence dans les études nutritionnelles et métaboliques et pour la comparaison aux résultats déjà obtenus. Les nanoliposomes seront destinés à termes, à valider des formulations complexes (nanoliposomes + molécules active) permettant de prévenir ou de ralentir les processus neurodégénératifs et les troubles cognitifs associés chez des sujets âgés. Il est donc indispensable de connaître l'effet du vieillissement sur leur biodisponibilité cérébrale. Ainsi, 90 souris mâles seront utilisées, divisées en deux groupes d'âge : 45 souris âgées de 6 mois (souris jeunes) divisées en trois sous-groupes : 5 souris non traitées, 20 souris traitées par nanoliposomes et 20 souris contrôles et 45 souris âgées de 18 mois (souris âgées) divisées en trois sous-groupes : 5 souris non traitées, 20 souris traitées par nanoliposomes et 20 souris contrôles. Pour les groupes recevant un traitement, une administration par gavage de nanoliposomes, cinq jours sur sept, sera réalisée

sur différentes périodes afin d'optimiser le protocole d'administration pour les études ultérieures. Les groupes contrôles seront gavés à l'eau, pendant des durées croissantes. Toutes les deux semaines, des prélèvements sanguins seront réalisés sur l'ensemble des animaux en vue des dosages de triglycéridémie et de cholestérolémie. Cinq animaux par groupe (nombre nécessaire et suffisant pour les études statistiques : réduction) seront mis à mort dans le but d'effectuer une analyse de la composition lipidique de différents tissus, en particulier le foie et le cerveau. Cet acte sera effectué en respectant les modalités stipulées par la réglementation en vigueur. L'objectif étant de déterminer la durée minimale de gavage pour obtenir un enrichissement cérébral maximal, plusieurs temps seront testés (2, 4, 6 et 8 semaines). Cela permettra de connaître la durée nécessaire et suffisante pour les études à venir (Réduction). Ce projet ayant également comme objectif d'évaluer l'effet de l'âge sur la biodisponibilité des acides gras administrés sous forme de nanoliposomes, les deux groupes d'âge (6 et 18 mois) seront comparés.

Le bien-être des animaux sera contrôlé quotidiennement et l'inconfort évité au maximum au cours de l'expérimentation, de manière à garantir la qualité des résultats (Raffiner).

En cas de dépassement de l'un des points limites définis (atteinte cérébrale massive constituant une souffrance importante, perte de poids de plus de 20% du poids initial sans récupération au bout de 4 jours, arrêt de la prise alimentaire solide et/ou liquide, état général traduisant une évolution vers la morbidité), les animaux seront mis à mort par une surdose d'anesthésique, leur décès sera vérifié par absence de battements cardiaques.

11568 Les cellules immunitaires Natural Killer (NK) appartiennent à la première ligne de défense du corps contre les agents pathogènes. En effet, ces cellules sont capables de reconnaître et d'éliminer les cellules infectées par un virus mais également les cellules cancéreuses. Cependant, en cas de sur-stimulation, les cellules NK vont devenir tolérantes et ne pourront plus exercer leur fonction. Cette situation explique que de nombreuses tumeurs échappent au contrôle exercé par les cellules NK. Restaurer la fonction des NK et ainsi leur contrôle sur la tumeur, est donc un objectif de portée thérapeutique et constitue le but de notre projet. Il existe chez la souris un modèle de tumeurs permettant d'induire l'épuisement des cellules NK. Cette perte de fonction est accompagnée de l'expression de certains récepteurs suppresseurs apparaissant suite à la sur-stimulation par les cellules tumorales à la fois en contexte de tumeurs solides ou hématologiques chez la souris. Notre objectif ici vise à caractériser le rôle des NK dans l'élimination de ces deux types de tumeurs c'est à dire de déterminer les moyens utilisés par les NK pour tuer les cellules cancéreuses et les métastases associées afin de proposer des thérapies ciblées par la suite. Les souris seront injectées avec différentes cellules tumorales engendrant ou non le processus d'épuisement puis la localisation de la tumeur et des métastases associées sera suivie par imagerie *in vivo*. Ensuite, l'élimination des cellules tumorales sera suivie après injection dans trois souches de souris mutantes pour certains gènes importants pour la fonction des NK afin de déterminer les voies utilisées par les NK pour éliminer ces cellules. Ce type de projet nécessite l'utilisation de modèles animaux, le nombre d'acteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu étant trop nombreux et leurs interactions trop complexes pour pouvoir être modélisés *in vitro*. Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Ainsi, le nombre d'animaux nécessaires a été calculé de façon à apporter des réponses statistiquement fiables tout en évitant des mises à mort inutiles. Afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés (738), des techniques de pointe permettant la mesure précise de différents paramètres dans les cellules seront utilisées telles que la cytométrie en flux multiparamétrique, la cytométrie d'image). Nous utiliserons également l'imagerie *in vivo* qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés (car les mêmes souris peuvent être suivies au cours du temps). Dans ce projet, la plus forte contrainte sur les souris sera la pousse tumorale que nous suivrons quotidiennement à partir de la deuxième semaine après l'injection. La douleur et l'angoisse seront évalués et nous avons défini des points limites adaptés au delà desquels les animaux seront mis à mort. Le stress induit par les mesures d'imagerie sera réduit par l'anesthésie préalable des animaux.

11569 La borréliose de Lyme (ou maladie de Lyme) est la première maladie vectorielle de l'hémisphère nord. Elle est due à un complexe d'espèces bactériennes *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl), transmis par une tique dure du genre *Ixodes*. Les bactéries responsables de la maladie font partie de la famille des spirochètes. La maladie touche l'homme mais aussi les animaux, et notamment les chiens.

Dans près de 70 % des cas, la maladie de Lyme est traitée efficacement par une antibiothérapie de 2 à 4 semaines. Non traitée, elle peut évoluer sur plusieurs années avec des conséquences potentiellement letales. Après une éventuelle phase dormante, cette maladie peut à terme, de manière aiguë et/ou chronique, se manifester par des formes cutanées, articulaires ou neurologiques.

Cependant, même si un traitement antibiotique est connu, la maladie de Lyme chez l'Homme et chez le chien est caractérisée par une grande diversité (génétique, épidémiologique, clinique et diagnostique) ; ce qui en fait souvent un challenge diagnostique pour les cliniciens. De ce fait, la maladie de Lyme est probablement sous diagnostiquée chez l'Homme et chez le chien. Ces difficultés de diagnostic rendent la solution vaccinale intéressante car pouvant protéger les individus de manière efficace et pérenne.

Le but de cette étude est de réaliser une preuve de concept d'un nouveau vaccin anti borréliose chez le chien, ciblant de nouveaux antigènes importants lors de la transmission précoce en vue d'en faire le premier vaccin Lyme neutralisant la transmission de la bactérie *Borrelia burgdorferi*.

Au cours de cette étude 16 chiens de race Beagle seront utilisés pour réaliser un test de challenge d'infection en utilisant des tiques infectées par *B. burgdorferi* afin de reproduire l'infection naturelle sur des animaux préalablement immunisés par la solution vaccinale.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement de produits vaccinaux injectés dans un organisme entier vivant.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de l'étude.

Un suivi clinique régulier des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et tout signe de souffrance important pour euthanasie pour raisons éthiques.

Le stress des animaux sera limité par le respect d'une période d'acclimatation d'au moins trois semaines avant le début de l'étude et en conservant les groupes dans le cas d'un hébergement collectif.

Les gestes techniques pouvant engendrer du stress ou une douleur seront réalisés sous anesthésie afin d'éviter toute souffrance de l'animal.

11570 Développés pour la première fois dans les années 1980 pour la neurochirurgie, les systèmes de chirurgie robotique n'ont depuis cessé de gagner en importance. Outre leur utilisation dans les domaines de la chirurgie cardiaque et de l'urologie, ils servent également surtout en chirurgie thoracique (thymectomies, résections pulmonaires).

- Au cours des 10 dernières années, la chirurgie robotique n'a cessé de gagner en importance dans le domaine de la chirurgie thoracique, en particulier pour la thymectomie et la lobectomie.

- Ainsi, la chirurgie robotique présente des avantages considérables par rapport à l'accès thoracoscopique (VATS), comme l'exposition et la vue d'excellente qualité des structures anatomiques et pathologies ainsi qu'une transmission naturelle intuitive des mouvements de la main de l'opérateur sur les instruments du télémanipulateur, avec des degrés de liberté accrus.

- De nombreuses études, en particulier celles se consacrant aux thymectomies assistées par robot, font état d'une sécurité élevée et d'une bonne faisabilité pour des taux de morbidité et mortalité comparables à la VATS.

- D'un autre côté, la chirurgie robotique génère des coûts plus élevés par rapport à la VATS ainsi que des durées opératoires souvent plus longues, mais avec une hospitalisation plus brève des patients.

- De nouveaux modèles et applications perfectionnés dans le domaine de la chirurgie robotique vont étendre les indications à d'autres interventions, comme par exemple l'anastomose en manchon, qui étaient jusqu'à présent réservées à la chirurgie ouverte.

L'utilisation du robot demande un apprentissage long et intensif. Cette prise en main passe par l'utilisation de Simulateurs qui miment en tout point l'utilisation du robot. Cette formation : « lobectomie pulmonaire assistée par un robot chirurgical chez le porc » a pour but de valider la maîtrise de cette technique micro-invasive par les internes en chirurgie thoracique. Elle est un passage incontournable avant l'utilisation chez l'homme.

Nous utiliserons des porcs charcutiers femelles ou males castrés de 45 à 60kg à raison de 1 par mois sur 3 ans soit 36 porcs.

Dans le cadre de la règle des 3Rs :

Remplacer : L'animal est ici le maillon final d'une formation, l'apprentissage des repères anatomiques, des gestes opératoires et de la maîtrise du robot seront effectués à travers des vidéos et des simulateurs.

Réduire : Plusieurs chirurgiens seront formés par session afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, suivant la dextérité des intervenants 3 à 5 chirurgiens par animale.

Raffiner : la formation *in vivo* ne sera réalisée qu'après une phase de formation théorique et *in vitro* à l'utilisation du robot. Les porcs seront prémédiqués de façon appropriée et l'ensemble des gestes chirurgicaux seront réalisés sous anesthésie générale monitorée avec analgésie morphinique. La procédure sera sans réveil avec mise à mort par surdose d'anesthésie (confirmé par le monitoring : ECG plat). Les porcs arriveront 7 jours avant l'intervention et seront hébergés en enclos intérieur sur caillebotis plastiques, leur espace de vie sera enrichie par des jouets dédiés type balles à bruit et disque à mordre. L'ensemble des procédures chirurgicales sera supervisé par un chirurgien expert en chirurgie robotique humaine et porcine.

11571 Comprendre comment les informations sensorielles sont triées et intégrées pour guider une réponse motrice appropriée est un défi majeur en neurosciences. Il apparaît que le réseau des ganglions de la base joue un rôle central dans ce processus. Au sein de ce réseau, le Noyau Accumbens (NAc) joue un rôle prédominant, en particulier quand les actions permettent d'obtenir des récompenses. Pour cela, le noyau accumbens intègre de nombreuses informations intéro- et extéroceptives. Nous étudions cette interface sensori-motrice dans le contexte de la motivation pour obtenir de la nourriture. De nombreuses données ont démontré que dans ce contexte, le fonctionnement de ce système est commun à tous les mammifères. Ainsi, nous emploierons le rat comme modèle expérimental. De nombreux travaux réalisés depuis plus d'un siècle ont défini les facteurs qui influencent le comportement de prise de nourriture chez cette espèce. Par ailleurs, les données anatomiques sont désormais très détaillées. L'utilisation d'une autre espèce requerrait de reproduire toutes ces données.

De nombreux travaux ont montré que la lésion du noyau accumbens empêche les rats d'utiliser les stimuli de l'environnement pour guider leur approche vers la nourriture. Ce projet s'intéresse à comprendre comment les informations intéroceptives, provenant du milieu intérieur, sont triées et intégrées par le noyau accumbens. Dans le cas du comportement alimentaire, l'état des stocks énergétiques est communiqué à l'ensemble de l'organisme via de nombreux signaux intéroceptifs en provenance du système digestif.

Nous avons identifié deux noyaux associatifs du thalamus (le noyau paraventriculaire et le noyau parafasciculaire) qui pourraient communiquer cet état interne au noyau accumbens et permettre ainsi de coordonner le comportement de recherche de nourriture. Nous étudierons comment ces régions thalamiques contrôlent l'activité des neurones du noyau accumbens et de ce fait le comportement de prise de nourriture.

Nous utiliserons une tâche où des rats auront la possibilité d'obtenir de la nourriture en appuyant sur un levier en réponse à un stimulus auditif. Afin d'obtenir une motivation suffisante, les rats seront soumis à une restriction alimentaire légère.

La pharmacologie et l'optogénétique seront employées pour manipuler l'activité de ces régions thalamiques afin d'en observer les conséquences comportementales lors de cette tâche. Nous prédisons que l'activation du noyau paraventriculaire du thalamus (PVT) augmentera la motivation pour la nourriture en masquant la satiété induite par la consommation de nourriture. A l'inverse nous prédisons que l'activation du noyau parafasciculaire (Pf) aura un effet opposé en jouant sur la capacité du noyau accumbens à détecter des stimuli extéroceptifs prédisant la présence de nourriture. Cette prédiction repose en partie sur le fait que le Pf projette préférentiellement sur les interneurons cholinergiques (IN ACh) du noyau accumbens.

Sur les mêmes animaux, nous emploierons l'électrophysiologie de neurones uniques afin de déterminer l'effet de la manipulation de l'activité de ces noyaux thalamiques sur l'encodage réalisé dans le noyau accumbens. Cette approche a le double avantage de (1) limiter le nombre d'animaux utilisés, et (2) de pouvoir étudier la corrélation entre les manipulations comportementales et électrophysiologiques sur les mêmes animaux. Un problème majeur dans l'étude des interneurons cholinergiques réside dans le fait que, chez le rat, ces neurones ne peuvent être ni identifiés par des critères électrophysiologiques classiques, ni être manipulés de façon sélective par des agents pharmacologiques. Pour parer ces limitations, nous emploierons l'optogénétique chez des animaux transgéniques ChATCre afin d'exprimer des canaux ioniques sensibles à la lumière spécifiquement dans les interneurons cholinergiques du noyau accumbens. Ceci permettra de manipuler et identifier l'activité de décharge de ces neurones.

Sur l'ensemble de ce projet, nous utiliserons 300 rats (dont 90 rats transgéniques ChATCre) repartis en 17 groupes expérimentaux de 15 à 30 animaux, réduisant le nombre d'animaux au minimum nécessaire à l'obtention de résultats valides. Le but de cette étude étant de comprendre comment des informations sensorielles, à la fois intero- et extéroceptives vont être traitées pour guider une réponse motrice adaptée, le recours à une méthode alternative permettant de remplacer l'utilisation de l'animal est impossible. De plus, le faible nombre de données existant sur l'activité électrique des neurones étudiés dans ce projet rend la substitution in silicio par des modèles computationnels également impossible. Les conditions d'hébergement dans un établissement utilisateur doté d'une structure du bien-être animal et les méthodes utilisées seront appropriées pour réduire le plus possible toute anxiété ou dommage durables que pourraient subir les animaux. Le suivi journalier (au moins) des animaux sera clairement défini avec interruption de l'expérimentation si l'un des critères d'arrêt est atteint. Dans le cas des chirurgies qui seront pratiquées, des traitements seront administrés afin de réduire au maximum la souffrance de l'animal. Nous utiliserons ainsi des anesthésiques (isoflurane et lidocaïne) et des antalgiques (carprofen, buprénorphine), appropriés pour les procédures employées. De cette manière, la règle des trois R sera respectée.

11572 Les virus Influenza aviaires hautement pathogènes provoquent une mortalité très élevée chez les Galliformes (poulets par exemple), alors que la majorité des infections par les virus Influenza aviaires hautement pathogènes restent asymptomatiques chez les Palmipèdes (canards par exemple). Les virus Influenza aviaires hautement pathogènes dérivent de virus Influenza aviaires faiblement pathogènes qui ont acquis des mutations dans leur génome. Le but de ce projet est d'étudier comment le pouvoir pathogène et la transmission des virus Influenza aviaires hautement pathogènes et des virus Influenza aviaires faiblement pathogènes peuvent évoluer en fonction des souches virales et des traitements médicamenteux donnés aux animaux. L'espèce hôte étudiée dans ce projet est le poulet (*Gallus gallus*). Nous étudierons six souches représentatives des virus Influenza aviaires ayant circulé ou en circulation en Europe. Au cours des cinq années consacrées à ce projet, nous utiliserons au total jusqu'à 1674 poulets mâles ou femelles.

Les animaux seront suivis quotidiennement (examen clinique par le vétérinaire responsable de l'essai). Des prélèvements seront effectués sur les oiseaux vivants (écouvillons trachéaux et cloacaux) et des prélèvements d'organes sur les animaux euthanasiés. Hormis les signes cliniques liés à l'infection par les virus Influenza, nous n'attendons pas d'effets secondaires dus aux traitements médicamenteux administrés aux animaux, ceux-ci étant soit utilisés en médecine vétérinaire dans les élevages ou dans des essais cliniques décrits dans la littérature scientifique.

Les conséquences de l'infection seront évaluées quotidiennement par le vétérinaire responsable de l'étude et elles seront comparées aux points limites définis dans le protocole de cette étude.

Ce protocole respecte les principes de remplacement (a), réduction (b) et raffinement (c) exposés ci-dessous :

a) L'utilisation d'animaux est nécessaire car les méthodes alternatives telles que la culture cellulaire ou les cultures d'organoïdes ne permettent pas d'évaluer le pouvoir pathogène qui ne s'exprime qu'à l'échelle de l'organisme entier et ou la transmission virale inter-individus qui ne peut être évaluée qu'entre des individus vivants.

b) Des expériences préalables réalisées en culture cellulaire permettent d'analyser certaines caractéristiques des virus, comme leurs capacités répliquatives. Ces expériences préalables permettent donc de sélectionner les virus présentant les phénotypes les plus intéressants et seulement ceux-ci seront inoculés aux poulets, permettant donc de réduire le nombre d'animaux utilisés pour les expériences.

c) Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, les mesures suivantes sont appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans la directive 2010 63 UE et dans l'Arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles ; enrichissement de l'environnement par un point d'eau adapté aux poulets.

- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) spécifiées dans l'Arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles ;

- Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien des animaux) sans restriction ;

- Habituation des animaux par une période d'acclimatation d'au moins cinq jours avant le début de l'expérience et manipulation des animaux par du personnel qualifié et expérimenté.

- Mise en place d'un suivi clinique quotidien par le vétérinaire responsable de l'essai et de points limites prédéfinis et précisés dans le paragraphe 3.4.13.

11573 Malgré des progrès remarquables en matière de prévention et de traitement, le cancer reste une cause majeure de mortalité dans le monde. Depuis quelques années, notre groupe est spécialisé dans le développement de stratégies de chimiothérapies sélectives ciblant les cellules tumorales. Les vecteurs anticancéreux que nous développons véhiculent un médicament vers la tumeur sous une forme non-toxique. Dans ce contexte, notre groupe s'est spécialisé dans le développement d'agents anticancéreux capables d'activer leur activité toxique uniquement après reconnaissance d'enzymes présentes dans le microenvironnement tumoral ou de récepteurs présents à la surface des cellules tumorales. Ces stratégies ont été validées *in vitro* sur des cellules en culture mais aussi *in vivo* chez des souris.

Dans ce projet, nous souhaitons administrer chez la souris des composés "A" et "B" non toxiques, capables d'interagir au niveau de la tumeur pour donner une molécule "AB" qui aura des propriétés anticancéreuses. En administrant des sous-unités non toxiques plutôt qu'un médicament déjà actif, nous devrions ainsi réduire les effets secondaires observés chez les patients. Pour mener à bien cette étude, nous réaliserons une seule procédure expérimentale pour un total de 110 souris.

Le développement de stratégies de création de médicament *in situ* au niveau de la tumeur ne peut pas être abordée *in vitro*. Ces expériences nécessitent obligatoirement l'usage de modèles animaux. Afin de réduire le stress des animaux généré par les expérimentations, ces dernières seront réalisées sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Par ailleurs, en cas d'apparition de douleurs chez les animaux une administration d'analgésique (buprénorphine) sera réalisée. Afin de pouvoir étudier notre stratégie thérapeutique chez des animaux, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives *in vitro* (remplacer). Comme

mentionné plus haut, la stratégie de ciblage des tumeurs a déjà été validée par notre laboratoire lors d'études préliminaires. Les données recueillies lors de nos précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales. Par une approche statistique, la « Règle des 3R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation tout en assurant un nombre suffisant permettant une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences (réduire). Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées (groupe de 5 souris, nid, jouets, etc) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffiner).

11574 La barrière hémato-encéphalique (BHE) sépare le sang du cerveau. Elle est principalement constituée de cellules endothéliales qui sont liées entre elles par des jonctions serrées étanches, rendant cette barrière très peu perméable aux molécules exogènes (ex : médicaments) mais aussi endogènes (ex : glucose, acides aminés). Cependant, des transporteurs exprimés sur cette BHE permettent l'acheminement de nombreuses molécules du sang vers le cerveau et vice-versa. Nos études s'intéressent à l'intégrité physique et fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique en conditions saines et pathologiques. En d'autres termes nous répondons aux questions suivantes : dans nos conditions pathologiques, la BHE est-elle toujours imperméable ? Ses mécanismes de transport sont-ils toujours présents ? Fonctionnent-ils de la même manière ? En effet, les états pathologiques, comme par exemple la maladie d'Alzheimer (MA), sont souvent associés à des modifications de la BHE qui pourraient, d'une part, être une cause ou au contraire une conséquence de la pathologie et d'autre part être responsable d'une modification des caractéristiques de transport des médicaments dans le cerveau.

L'étude du passage de molécules à travers la BHE est très difficile *in vitro* car les modèles existants ne reproduisent pas l'ensemble des mécanismes de barrière, limitant fortement leur utilisation dans le domaine d'étude de la BHE. C'est pourquoi nous utilisons des animaux, sains (souris sauvages) et pathologiques (souris transgéniques pour la MA). Nous prévoyons d'utiliser 1428 souris (714 souris transgéniques et 714 souris sauvages) pour la durée totale du projet. Notre projet, d'une durée de cinq ans, vise à évaluer l'état de la BHE chez deux modèles murins de MA, à trois stades d'évolution de la maladie (précoce, intermédiaire et tardif). Nous évaluerons la perméabilité vasculaire de ces souris ainsi que la fonction des transporteurs mis en jeu pour le passage de la BHE de molécules endogènes, impliquées dans la physiopathologie de la MA (5 molécules), et exogènes (12 molécules).

Ainsi, l'ensemble des souris de nos élevages sera utilisé pour nos expériences (mâles et femelles) et le nombre d'animaux par groupe sera de 7, ce qui, d'après des études précédentes utilisant des procédures similaires, correspond au plus petit nombre de souris permettant une validité statistique de nos résultats.

Afin de limiter le plus possible la souffrance et l'anxiété infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale. Nous injecterons nos molécules d'intérêt dans la circulation sanguine des souris et nous mesurerons leurs concentrations dans le cerveau quelques minutes après l'injection et euthanasie de la souris.

La réalisation de ce projet permettra d'une part de mieux comprendre le fonctionnement de la BHE de souris dans les conditions pathologiques de la maladie d'Alzheimer, d'autre part d'optimiser les médicaments utilisés actuellement dans le traitement de cette pathologie voire d'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques et enfin de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

11575 Parmi les différentes classes d'anticorps qui nous protègent des infections, l'une d'entre elles, la classe des immunoglobulines A (IgA), semble jouer un rôle majeur dans l'immunité muqueuse et systémique mais garde des aspects mystérieux et ambivalents. Elle peut ainsi selon les situations se révéler capable de déclencher une réponse inflammatoire protectrice ou bien au contraire anti-inflammatoire et inductrice de tolérance. De même et pour des raisons qui restent très mal comprises, cette classe d'anticorps IgA est fréquemment impliquée dans des pathologies où le système immunitaire est lui-même agresseur de l'organisme et responsable de lésions immuno-pathologiques. Le rein est dans ce cadre une cible fréquente, et la néphropathie à IgA (NlgA ou

« maladie de Berger ») constitue ainsi en France la plus fréquente des glomérulopathies et l'une des grandes causes d'insuffisance rénale chronique pouvant conduire à la dialyse rénale ou la greffe.

Dans la NlgA (de même que dans d'autres pathologies proches comme le purpura rhumatoïde), les IgA ont la capacité de se déposer sur le mésangium rénal et d'y induire des lésions. Pour des raisons mal comprises, le phénomène de dépôt rénal d'IgA peut en fait s'accompagner chez l'homme de tableaux très différents : les dépôts peuvent se développer de façon passive sans manifestation clinique (ils sont d'ailleurs présents chez 10% des personnes bénéficiant une autopsie) ; à l'inverse ils peuvent s'accompagner de signes d'atteinte glomérulaire réalisant la néphropathie à dépôts d'IgA (N-IgA) souvent lentement progressive mais parfois au contraire rapidement évolutive, témoignant d'une agressivité des dépôts d'IgA liée à leur capacité à déclencher un conflit majeur et une inflammation localisée au glomérule. L'hétérogénéité clinique et histologique de la N-IgA correspond vraisemblablement à des caractéristiques antigéniques et physico-chimiques particulières des molécules d'IgA déposées. Leur degré de polymérisation et leurs anomalies de glycosylation peuvent intervenir. Il n'est cependant pas clair aujourd'hui de savoir si les IgA promptes à se déposer sont de haute ou basse affinité, antigène-spécifiques et/ou auto-réactives. Les éléments susceptibles de déclencher une réaction inflammatoire restent en grande partie mystérieux. Nous souhaitons préciser ces différents points.

Nos objectifs sont alors de préciser les facteurs qui favorisent les dépôts d'IgA sur le mésangium rénal et qui déclenchent la réaction inflammatoire secondaire à l'origine de la N-IgA : si les IgA promptes à se déposer sont de haute ou basse affinité, antigène-spécifiques et/ou auto-réactives, quelles sont leurs propriétés physico-chimiques, leurs isotypes et leurs lieux de production. De plus on veut savoir quel est le rôle de l'inflammation intestinale et quels éléments sont susceptibles de déclencher la réaction inflammatoire glomérulaire.

Ce projet utilise au total 600 souris.

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

Remplacer : La néphropathie à IgA est une maladie complexe et hétérogène. Elle est multifactorielle du fait que plusieurs facteurs contribuent à sa pathogénèse. Les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de ces mécanismes moléculaires et physiologiques complexes intervenant et impliquant des interactions tissulaires et cellulaires d'un organisme entier.

Réduire : L'utilisation de la souris permet de réduire la variabilité individuelle grâce à son fond génétique. Les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. Les manipulations sont réalisées de façon indifférente sur des mâles et des femelles, permettant ainsi une réduction du nombre d'animaux générés dans l'élevage. A la fin de l'expérimentation, les souris sont euthanasiées et tous les organes d'intérêt pour toutes les manipulations sont prélevés pour la suite de l'étude pour réduire la répétition des manipulations.

Raffiner : Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie pour le prélèvement de sang, pommade ophtalmique). Les souris sont euthanasiées par dioxyde de carbone utilisant un appareil automatisé Quietec conforme à la réglementation qui augmente progressivement la concentration de CO₂ avant tout prélèvement d'organe ou tissu.

11576 Les anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) représentent une cause importante de morbi-mortalité chez les sujets âgés de 65 à 85 ans et un coût socio-économique conséquent. Les mécanismes de formation des AAA sont encore méconnus. Sans traitement chirurgical, le devenir de l'AAA chez l'homme est la rupture de l'aorte pouvant provoquer la mort du patient. Nos précédents travaux ont pu montrer que la pathologie parodontale, jouait un rôle dans la progression de la maladie. La parodontite est une maladie d'origine infectieuse qui se caractérise par une destruction du tissu de

soutient de la dent qui aboutit à la perte de celle-ci. Ce lien entre maladies parodontales et maladies cardiovasculaires a pu être décrit aussi chez l'animal sans toutefois connaître les mécanismes d'action des bactéries parodontales notamment en termes de cicatrisation de la paroi aortique et de réponse inflammatoire.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer le rôle de *Porphyromonas gingivalis* (Pg, une des principales bactéries parodontales) et de ses facteurs de virulence dans l'AAA dans deux modèles murins :

i/ l'infusion aortique d'elastase pancréatique chez le rat Wistar. Après anesthésie, le rat subira une ouverture abdominale afin d'isoler l'aorte pour y injecter une solution d'elastase pancréatique.

ii/ le modèle de la souris ApoE^{-/-} rendue hypertendue par infusion d'angiotensine II. Après anesthésie une ouverture sous-cutanée sera faite au niveau dorsal afin d'y insérer une mini-pompe osmotique contenant l'angiotensine II.

Le nombre de rats utilisés pour la période du projet est de 60 et le nombre de souris est estimé à 84.

La durée globale de cette étude est de deux ans.

Ce projet est construit en intégrant au maximum la préconisation des 3 R. A l'heure actuelle, pour étudier les AAA, il est nécessaire d'utiliser des modèles animaux car il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant de mimer la pathologie. Afin de réduire le nombre d'animaux inclus dans des protocoles expérimentaux, le nombre d'animaux que nous utiliserons dans cette étude a été défini grâce à une étude statistique permettant d'obtenir une différence significative à un seuil inférieur à 0,05. Durant toute la période de l'étude (28 jours), tout sera mis en œuvre pour réduire au maximum le stress des animaux (hébergement en groupe et éléments d'enrichissements : blocs à ronger et possibilité de nidification). A la fin de l'étude, les animaux sont euthanasiés.

La surveillance des animaux se fait tous les jours. Si un animal venait à présenter des signes de douleurs (prostration, tremblements, aspect du poil), un traitement antidouleur sera mis en place et enfin si l'animal présente des signes de mal-être importants ou des points limites atteints (paralysie des pattes arrières et perte de poids supérieure à 20%), l'animal sera euthanasié.

Enfin, quand cela est possible, nous remplacerons les expériences sur les animaux par des expériences *in vitro* sur des cultures cellulaires.

11577 Notre bureau d'études est spécialisé dans les suivis piscicoles en rivières et offre une gamme de services et d'outils permettant de concilier les activités humaines avec les exigences légales en termes de protection de l'environnement.

Nous nous appuyons sur une expertise scientifique qualifiée, construite et cultivée avant tout sur le terrain.

Notre activité de service conseil offre un accompagnement des projets industriels et des projets de restauration environnementale. Nous avons développé une expertise en suivi de la faune piscicole, autant pour des aspects démographiques que comportementaux. Actuellement, des Directives Européennes imposent aux états membres de l'UE des objectifs ambitieux en termes de restauration de la continuité écologique. Il s'agit concrètement d'aménager les rivières pour permettre aux poissons de franchir les ouvrages à la montée comme à la descente. Dans ce cadre, nous proposons notre expertise et des outils particulièrement innovants pour valider l'efficacité et l'attractivité des échelles à poissons construites en nombre ces dernières années.

La télémétrie adaptée au suivi piscicole est un outil maîtrisé et utilisé par nos biologistes. Le but est de suivre individuellement les déplacements des poissons préalablement marqués. Ainsi, il est notamment possible d'étudier l'efficacité des échelles à poissons, la fréquentation d'habitats récemment restaurés (frayère, zone de repos, etc.) ou encore le comportement à proximité d'un barrage. Des antennes couplées à des récepteurs sont placées sur les sites d'étude afin d'enregistrer en continu les mouvements des poissons.

Nos activités demandent donc de réaliser des marquages de poissons et d'effectuer des actes chirurgicaux sous anesthésie. Le nombre total maximal de poissons entrant dans le projet est 1000 par année. C'est pourquoi, nous réalisons aujourd'hui cette demande d'autorisation de projet.

Règle des 3R :

Remplacement : nous intervenons sur les espèces pour lesquelles ses clients ont identifié un besoin de connaissances. Il s'agit régulièrement des espèces cibles des rivières étudiées.

Réduction : Pour ses études, nous choisissons de limiter au maximum le nombre d'individus à équiper mais un minimum de 30 individus par espèces est requis pour des questions de robustesse des analyses statistiques.

Raffinement : Les poissons sont maintenus dans des conditions de stabulation appropriées (grand volume d'eau, aération permanente, abris, etc.). Les opérations sont toujours réalisées sous anesthésie afin d'éviter une quelconque douleur.

11578 Rôle de l'activité corticale dans la survie des neurones produits dans le bulbe olfactif de souris adulte :

Jusqu'à récemment, le cerveau adulte était considéré comme un organe dépourvu de toute capacité régénératrice et condamné à perdre inéluctablement ses éléments les plus précieux : les neurones. Cette vision rigide de l'organe cérébral a longtemps fait figure de dogme dans le domaine des neurosciences. Pourtant, cette vision a été définitivement remise en cause par une série de travaux récents. En effet, il a été prouvé que le cerveau possède, en son sein, une réserve de cellules souches neurales capables de donner naissance à des jeunes cellules nerveuses tout au long de la vie de l'individu. Le cerveau est donc capable de se régénérer.

Cette découverte a fait naître un espoir considérable et permet d'envisager des stratégies thérapeutiques basées sur cette capacité régénératrice endogène du cerveau adulte. On peut espérer un jour être capable de remplacer des cellules nerveuses perdues à la suite d'un accident cérébral ou au cours de l'évolution d'une maladie neurodégénérative par des neurones sains et fonctionnels produits au cœur même du cerveau du patient.

Bien sûr, le chemin sera long pour atteindre ce but. Il faudra tout d'abord comprendre précisément les mécanismes qui conduisent un jeune précurseur neuronal à devenir un neurone mature et fonctionnel. Il nous faudra également comprendre pourquoi certaines cellules sont intégrées durablement tandis que d'autres sont rapidement éliminées.

Le bulbe olfactif, premier relai central de traitement de l'information olfactive est une cible majeure de cette neurogenèse continue. Parmi les nombreux facteurs susceptibles d'influencer le devenir de ces jeunes cellules, nous proposons d'étudier l'activité nerveuse de la zone ciblée et en particulier l'activité déclenchée par des signaux provenant d'aires cérébrales plus ou moins lointaines.

Nous cherchons à comprendre comment de nouvelles cellules peuvent s'intégrer dans les réseaux neuronaux complexes du cerveau adulte et en particulier comment l'activité globale du cerveau peut influencer ce phénomène. Pour ce faire il est aujourd'hui impossible d'éviter l'utilisation d'un modèle animal. Cependant, les méthodologies et les approches statistiques employées nous permettront de réduire le nombre d'individus nécessaire.

La mise en place de ce programme d'une durée de cinq ans nécessitera l'utilisation de 1260 souris. Les procédures expérimentales proposées ont été élaborées en veillant à réduire le stress ou la souffrance des animaux. Les interventions chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale. La prévention de la douleur sera assurée par un traitement antalgique pré-opératoire et post-opératoire. Un anti-inflammatoire stéroïdien sera également administré pendant les 7 jours suivant l'intervention pour réduire toute réponse inflammatoire locale.

Des années de pratique ont permis à notre laboratoire d'affiner ces procédures afin d'améliorer le suivi et la prise en charge des animaux ainsi que la fiabilité et la reproductibilité des résultats.

11579 Face au cas de Peste Porcine Africaine (PPA) déclarés en Belgique depuis septembre 2018, à quelques kilomètres de la frontière française, la France met en place un dispositif important pour prévenir l'apparition de cette maladie sur le territoire. En effet, la déclaration de cette maladie provoquerait de grosses pertes économiques pour la filière, directes par la mort des porcs en élevage, et indirectes par la fermeture des frontières et l'arrêt de l'exportation.

Les vétérinaires sanitaires ont un rôle primordial dans la détection précoce de cette maladie, par la reconnaissance de symptômes. La confirmation d'une suspicion de PPA se réalise à partir d'une prise de sang.

L'objectif de ce projet est de former 12 vétérinaires sanitaires à la contention et à la réalisation des prises de sang sur porcins.

Le projet propose une formation sur une journée avec une partie théorique assurée par la Direction Départementale de la Protection des Populations et une partie pratique assurée par des zootechniciens experts de l'espèce porcine. La formation prévoit l'utilisation de 4 porcs par vétérinaire sanitaire à former soit un total de 48 animaux.

Pour chaque animal, un expert métier montrera les bonnes pratiques et les gestes techniques à réaliser pour effectuer la contention et le prélèvement dans le respect de la réglementation et du bien-être animal en limitant au maximum le stress lié à la contention.

On pourra REDUIRE le nombre d'animaux et de prélèvements en fonction de l'agilité des vétérinaires sanitaires.

Le RAFFINEMENT proposé est basé sur différents points :

- Les conditions d'hébergement : les animaux seront hébergés dans des loges sur caillebotis équipés de chaînes et balles (jouets) avec accès à l'eau *ad libitum* et nourriture matin et soir.

- Les interventions seront réalisées dans le calme avec récompense alimentaire.

REMPLENER l'utilisation de l'animal dans ce projet n'est pas possible puisque l'apprentissage technique de la contention et de la prise de sang chez le porc passe obligatoirement par une formation pratique sur animal vivant.

11580 Des mutations dans la protéine COL4A1, qui est un composant majeur des cellules des vaisseaux, sont responsables d'une forme héréditaire d'hémorragies cérébrales spontanées chez l'homme, pour laquelle il n'existe aucun traitement. IL a été démontré que, dans cette maladie, les hémorragies cérébrales résultaient d'anomalies complexes des cellules murales des artères cérébrales et que des lésions identiques étaient présentes au niveau des artères de l'oeil— un organe où elles sont plus aisément analysables.

Ce projet vise à mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la survenue des lésions artérielles et des hémorragies cérébrales, avec un objectif spécifique : confirmer *in vivo* l'implication de 3 voies de signalisation pour lesquelles des études *ex vivo* ont révélé une activation anormale.

La complexité des interactions vaisseaux –cerveau- pression artérielle fait qu'il est fondamental d'étudier ces anomalies sur l'animal vivant, soumis à l'ensemble des systèmes régulateurs, de façon parfaitement intégrée. Seule la souris possède un modèle génétiquement modifié mimant la maladie humaine.

Nous étudierons l'effet de la réduction génique ou de l'inactivation pharmacologique de récepteurs, ligands ou facteurs de transcription clés de ces 3 voies de signalisation dans un modèle de souris génétiquement modifiée mimant la maladie COL4A1. Le nombre total maximal de souris nécessaire à la réalisation de ce projet est de 845 pour une durée de 5 ans.

Ce projet met en jeu l'administration intrapéritonéale de tamoxifène pour induire la réduction d'expression d'un gène, des injections intraoculaires répétées d'anticorps bloquant et une perfusion intracardiaque de fixateurs en vue de réaliser des analyses histologiques sur la rétine et le cerveau prélevés après la mort de la souris.

Pour réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons une approche pharmacologique, lorsque cela est possible, les différents gènes seront testés de façon séquentielle et enfin nous avons estimé la

taille des échantillons permettant une analyse statistique robuste des résultats grâce au jeu de données collectées au cours d'expériences précédentes.

Pour réduire au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, le site d'injection intrapéritonéal sera alterné d'un jour à l'autre. Les injections intraoculaires seront réalisées sous anesthésie générale et locale avec une médication postopératoire. Les souris seront observées quotidiennement à la recherche de troubles neurologiques qui pourraient affecter leur capacité à se nourrir correctement et une grille précise des points limites sera utilisée. La perfusion intracardiaque de fixateurs sera réalisée sous anesthésie générale profonde sans réveil.

Ce projet de recherche fondamental a pour but de comprendre plus précisément les voies moléculaires impliquées dans la survenue des hémorragies cérébrales dans la maladie COL4A1. Ils pourront permettre le développement de médicaments ciblant les voies mises en cause, permettant ainsi de prévenir la survenue des hémorragies cérébrales chez les patients.

11581 Dans le cerveau, des cellules spécialisées, les astrocytes, favorisent le bon fonctionnement des neurones. Les astrocytes ont aussi la propriété de réagir aux lésions du système nerveux central en changeant leur structure et leur métabolisme. Ce phénomène largement décrit mais encore mal compris est appelé la réactivité astrocytaire. Il survient notamment au cours de la maladie d'Alzheimer (MA), une maladie neurodégénérative incurable qui touche 900 000 personnes en France.

Le but du projet est de déterminer si la réactivité des astrocytes altère leurs fonctions de soutien envers les neurones au cours de la MA et, donc, si les astrocytes constituent potentiellement une cible thérapeutique pour la MA.

Les maladies neurodégénératives affectent le cerveau et conduisent à des altérations complexes du fonctionnement cérébral et du comportement. Ni la modélisation informatique ni l'expérimentation sur cellules *in vitro* ne permettent aujourd'hui d'appréhender ces processus très complexes. De plus, notre projet s'intéresse aux interactions entre les neurones et les astrocytes et seule l'étude du cerveau entier *in situ* permet de conserver la complexité de ces interactions.

Le modèle choisi pour cette étude est le rongeur. Nous avons développé une méthode pour bloquer la réactivité astrocytaire dans deux modèles rongeurs de la MA et nous allons en évaluer les conséquences sur des symptômes de la MA au niveau comportemental, histologique et fonctionnel. Par exemple, son effet sur le métabolisme neuronal sera suivi par imagerie intracérébrale, une technique non invasive.

Les méthodes expérimentales ont été choisies en accord avec le vétérinaire de l'installation, pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux.

Le projet prévoit au maximum 300 rongeurs nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Notre plan expérimental permet de réduire le nombre total d'animaux impliqués grâce à l'utilisation de méthodes de suivi longitudinal par imagerie cérébrale et par l'analyse de plusieurs paramètres sur les mêmes animaux.

Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule de l'établissement chargée du bien-être animal.

11582 La dégradation de la qualité chimique de l'eau due à l'intensification des activités humaines est au cœur des préoccupations des politiques publiques. Les impacts des contaminants sur la faune sauvage sont encore très largement méconnus et les études se limitent souvent à des évaluations de niveau de contamination. Les organismes situés en fin de chaîne alimentaire représentent des intégrateurs des processus sous-jacents. Ainsi les espèces prédatrices et longévives exploitent des habitats souvent variées, présentent des niveaux de contamination parfois élevés et vont jouer un rôle de sentinelle de l'état des milieux.

La contamination des masses d'eau a été principalement quantifiée sur les peuplements piscicoles. A l'inverse les reptiles sont peu étudiés en écotoxicologie. Dans ce contexte nous proposons de focaliser notre projet sur la Cistude d'Europe, *Emys orbicularis*. Cette espèce de tortue d'eau douce longévive prédatrice (espérance de vie > 40-60 ans) fait face à un déclin important du fait de multiples pressions anthropiques.

Ce projet repose sur des suivis de population déjà en place. Nous souhaitons comparer trois noyaux de populations de cistudes vivant dans des habitats qui diffèrent par leur exposition aux contaminants organiques historiques et persistants : polychlorobiphényles (PCB) et pesticides organochlorés ainsi qu'aux éléments traces métalliques.

Deux procédures légères sont prévues :

Procédure 1 : des prises de sang seront réalisées au niveau de la veine caudale afin de mesurer les niveaux de contaminant.

Procédure 2 : mesure sur les individus (comportement, coloration).

Seuls les individus d'une masse supérieure à 300g seront étudiés.

Un effectif maximum de 90 individus par an est prévu (30 par site) soit un total de 360 individus sur les 4 ans du projet.

La règle des 3 R a été prise en compte de la manière suivante : Remplacement : les questions étudiées concernent spécifiquement la cistude d'Europe. Un remplacement n'est donc pas envisageable. Réduction : Nous avons réduit au minimum les effectifs par groupe et par an (30). Raffinement : la prise de sang sera réalisée sur la veine caudale car cette technique minimise le stress de contention et est très bien maîtrisée. Le maintien transitoire en captivité sera bref. Toutes les mesures seront collectées en moins de 5h pour permettre un relâcher le jour même sur le terrain.

11583 Comprendre et prédire les réponses des organismes aux changements climatiques est un enjeu majeur en écologie. Ces changements impliquent à la fois des variations de température et d'accessibilité à l'eau au sein des habitats naturels. Les réponses physiologiques à ces paramètres environnementaux sont généralement étudiées de manière isolée, alors qu'elles sont susceptibles d'interagir. La clarification de ces interactions, à travers une approche éco-physiologique, est une étape cruciale à la compréhension des effets des changements climatiques.

Les réponses hormonales aux conditions hydriques et thermiques conjointes sont des mécanismes pertinents pour comprendre les réponses des organismes aux changements climatiques. Des études précédentes chez les reptiles suggèrent le rôle de la corticostérone dans les réponses aux conditions hydriques et thermiques et des variations de ces taux pourraient permettre des réponses au réchauffement climatique et à la sécheresse. L'objectif principal de ce projet est d'identifier et de clarifier les effets combinés de l'exposition ponctuelle à des conditions thermiques et hydriques contrastées sur la physiologie d'un ectotherme, la vipère aspic (*Vipera aspis*). Cette approche permet d'identifier les conflits physiologiques entre besoins hydriques et thermiques, à l'échelle de l'individu.

La vipère aspic est un modèle particulièrement pertinent pour tester nos hypothèses compte tenu de la forte dépendance de cet ectotherme aux conditions hydriques et thermiques de ses habitats. Les conséquences physiologiques de conditions thermiques ou hydriques ont déjà été étudiées de manière isolée chez cette espèce, mais jamais de manière croisée. Pour ce faire, les individus vont être exposés pendant 3 semaines à deux conditions d'accès à l'eau (restriction ou accès) combinée à deux régimes thermiques contrastés (chaud ou froid) au sein de la gamme physiologique. Ce travail sera effectué sur des individus issus d'un groupe captif, sur un effectif total minimisé à 48 animaux (12 individus par groupes, 4 conditions), étant donné la forte variabilité individuelle des réponses aux conditions hydriques et thermiques chez les reptiles. L'effet du traitement expérimental sur la physiologie sera quantifié au travers de mesures de taux hormonaux (prises de sang) et de mesures de traits morphométriques et comportementaux.

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

- Remplacement : L'étude concerne spécifiquement les réponses physiologiques d'adultes de cette espèce. Il n'est pas possible de remplacer les vipères vivantes par d'autres processus, les individus sauvages ont été remplacés par des individus captifs issus de populations reproduites en captivité.
- Réduction : Le nombre d'individus sera réduit au minimum (12 par groupe) pour permettre de détecter des différences hormonales significatives. Ce choix d'effectif est basé sur des travaux précédents et un test de puissance
- Raffinement : La restriction hydrique est réduite à une période courte et telle qu'elle peut survenir en conditions naturelles. Les régimes thermiques choisis correspondent à des conditions naturelles au sein de la gamme physiologique de cette espèce. La durée de manipulation est réduite au minimum et la quantité sang prélevée sera limitée à 150 microlitres par prise. Les conditions d'hébergement en captivité sont optimisées.

11584 Ce projet vise à déterminer le rôle des monocytes/macrophages dans le processus de régénération tissulaire et vasculaire d'un tissu lésé par exposition aux rayonnements ionisants. Cette étude aborde d'une part les mécanismes fondamentaux de compréhension des monocytes/macrophages et d'autre part l'interaction de cette population cellulaire avec une stratégie thérapeutique basée sur l'injection d'exosome.

L'exposition à de fortes doses d'irradiation entraîne une raréfaction vasculaire et le développement d'une fibrose. La modulation de l'inflammation pourrait limiter la mise en place et le développement de cette pathologie. Le modèle animal utilisé est la souris qui est un modèle de référence pour les études précliniques et permettant l'utilisation d'animaux déficients. Dans ce projet deux modèles de souris transgéniques présentant une invalidation de deux récepteurs impliqués dans le processus seront utilisés.

Pour ce projet, le nombre estimé d'animaux est de 168.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, ce protocole expérimental est établi avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale. Différents paramètres fonctionnels seront mesurés par les techniques non invasives pour évaluer la régénération tissulaire et vasculaire. D'autres analyses seront réalisées sur des prélèvements faits sur animal euthanasié.

11585 La mise en place d'une défense efficace par le système immunitaire fait intervenir des cellules spécialisées, les lymphocytes B. Au cours de leur vie, ces lymphocytes subissent des modifications de leur ADN (cassures doubles brins de l'ADN et mutations) au niveau des gènes des anticorps (immunoglobulines). Ces modifications sont étroitement contrôlées par des sortes d'interrupteurs génétiques appelés « enhancers ». Les nombreuses études préliminaires effectuées sur des lignées cellulaires et sur des modèles transgéniques simples ont établi les bases des mécanismes régulateurs de l'expression des gènes d'immunoglobulines. Cependant, de nouveaux modèles murins KO, réalisés dans le gène des immunoglobulines sont indispensables pour d'une part valider ou invalider les hypothèses précédentes et d'autre part pour étudier le rôle de ces enhancers au cours du développement du lymphocytes B.

Les expérimentations seront réalisées dans le respect de la règle des 3R : le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum, le raffinement est respecté (conditions d'hébergement des animaux et l'utilisation d'anesthésie/analgésie. Le remplacement n'est pas possible car l'étude dans des lignées cellulaires n'est pas possible.

Ce projet expérimental utilise 242 souris mais répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier, à titre d'exemple les mécanisme d'hypermutation somatique ne peuvent être reproduits *in vitro*.

Réduire : Les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie au besoin).

11586 L'hypertension pulmonaire est une maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons et dont le symptôme principal est l'essoufflement à l'effort. Ces vaisseaux transportent le sang à partir du cœur vers les poumons, où il se charge en oxygène (O₂) pour alimenter tout l'organisme. Il est estimé de 15 à 25 cas pour un million d'habitants et le pic de fréquence se situe entre 30 et 40 ans. L'évolution naturelle de cette maladie varie fortement d'un individu à l'autre, mais elle conduit à une insuffisance cardiaque droite responsable du décès du patient seulement quelques années après la déclaration de la maladie. De nombreux médicaments permettent de réduire les symptômes de l'hypertension pulmonaire, cependant aucun ne permet à ce jour un traitement complet de la maladie. Lorsque l'hypertension pulmonaire menace la vie du patient, ces patients peuvent subir une greffe cœur-poumon. Chez le patient, le déclencheur de la transplantation est l'état du ventricule cardiaque droit. Ainsi, la découverte de nouveaux biomarqueurs apparaît primordiale afin de déterminer précocement l'apparition de la défaillance cardiaque droite. Nous souhaitons identifier ces biomarqueurs par l'étude des métabolomes circulants et tissulaires (ventricule droit et gauche) dans 2 modèles animaux expérimentaux d'hypertension pulmonaire. Le prélèvement de tissus ventriculaires sur des patients en insuffisance cardiaque étant très risqué, il est indispensable de pouvoir réaliser ces expériences sur des animaux. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées, tant que cela est possible, par des méthodes non invasives (échocardiographie) permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de rats utilisés sera de 160 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. A l'heure actuelle les mécanismes responsables du développement de l'hypertension artérielle pulmonaire sont mal connus c'est pourquoi nous allons utiliser pour ce projet un modèle expérimental d'hypertension pulmonaire afin d'analyser les mécanismes impliqués dans la défaillance cardiaque droite, qui est responsable du décès des patients atteints d'hypertension pulmonaire.

11587 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune inflammatoire du système nerveux central. Il s'agit de la cause la plus fréquente d'invalidité neurologique chez les jeunes adultes. Le diagnostic repose sur la présence de divers symptômes cliniques et de signes radiologiques en imagerie par résonance magnétique (IRM), extrêmement sensible à la détection de lésions de la substance blanche cérébrale (myéline). Cependant, les mesures classiques en IRM (nombre, type et localisation des lésions) restent peu corrélées avec l'invalidité et manquent de valeur pronostique. Plusieurs thérapies anti-inflammatoires sont utilisées en première ligne, mais ont peu d'effet sur l'évolution du handicap à long terme. De nouveaux traitements visent à promouvoir la réparation de la myéline, avec l'espoir de restaurer certaines capacités cérébrales. Un défi urgent à relever pour l'évaluation clinique de ces nouveaux traitements est d'identifier une mesure fiable des variations de quantité de myéline, c'est-à-dire un biomarqueur d'imagerie *in vivo* de la myéline. Certaines techniques avancées d'IRM sont prometteuses mais pas totalement sélectives de la myéline ni assez standardisées pour une large utilisation. La tomographie par émission de positons (TEP), une technique de médecine nucléaire consistant à injecter un traceur radioactif reconnaissant une cible

donnée (radiotraceur), peut permettre une détection directe des modifications de la myéline avec la sensibilité et la spécificité requises. Un premier radiotraceur marqué au carbone-11, a montré la faisabilité et le potentiel de cette approche pour suivre l'évolution du contenu en myéline dans les lésions de la SEP. Pour étendre l'utilisation clinique de la TEP, des traceurs radiomarqués au fluor-18 sont nécessaires, car la courte demi-vie du carbone-11 limite la technique à quelques centres équipés d'un cyclotron. L'objectif de ce projet est donc de progresser vers une deuxième génération de radiotraceurs de la myéline, radiomarqués au fluor-18, et démontrant que la TEP de la myéline apporte de nouvelles informations non disponibles et complémentaires aux techniques avancées d'IRM. L'induction d'une encéphalite auto-immune chez le singe va permettre de comparer directement ces radiotraceurs fluorés au radiotraceur standard carboné, ainsi qu'à différentes techniques IRM avancées (c'est-à-dire supposées spécifiques à la myéline). Cette comparaison de différentes techniques d'imagerie de la myéline n'a jamais été réalisée.

Au cours des 5 années de ce projet, 30 macaques cynomolgus (*macaca fascicularis*) issus d'un élevage agréé seront utilisés pour l'évaluation de 5 radiotraceurs au maximum. Une première procédure, de classe modérée, concernant 5 animaux visera à définir la meilleure stratégie de quantification des images en l'absence de pathologie (1 animal contrôle pour chaque radiotraceur candidat). Dans la deuxième procédure, de classe sévère, 25 animaux au maximum (5 par radiotraceur) seront immunisés par des injections sous-cutanées répétées chaque mois, dans le but de provoquer l'apparition de lésions cérébrales démyélinisantes et de symptômes moteurs associés, avec notamment une perte des capacités motrices ou un trouble de la coordination motrice (parésie, ataxie modérée, tremblements, chutes). Une évaluation clinique individuelle (signes neurologiques, de douleur et de stress) sera réalisée quotidiennement, éventuellement par vidéo, tout au long de cette procédure. Un score clinique sera attribué afin de quantifier la gravité des symptômes induits et de prendre les mesures de soutien nécessaires. Ces animaux bénéficieront de plusieurs examens TEP/IRM réalisés sous anesthésie générale en fonction de l'évolution de leur score clinique. L'euthanasie des animaux sera effectuée en fin de suivi d'imagerie, ou précocement si les animaux atteignent les points limites définis. Dans tous les cas, le cerveau sera prélevé pour valider les observations faites en imagerie.

Application des 3R.

Remplacer : ce projet fait suite à un travail sur le rat, qui a identifié une famille de radiotraceurs candidats prometteurs marqués au fluor-18. La décision de mener une évaluation clinique chez les patients avec l'un de ces radiotraceurs requiert une preuve de concept chez un gros animal sur lequel on pourrait tester des méthodes d'imageries translationnelles. Le macaque cynomolgus possède un volume de substance blanche comparable à l'homme, permet l'utilisation d'équipements dédiés aux patients humains (TEP-IRM), et constitue une espèce de référence dans les modèles expérimentaux de sclérose en plaque chronique. D'autres modèles, tels que la souris ou le marmouset, ne remplissent pas toutes ces conditions.

Réduire : 6 animaux, dont 1 contrôle, sont prévus pour chaque radiotraceur candidat, ce qui est le minimum permettant de conclure sur la validité d'un biomarqueur d'imagerie, compte-tenu de la variabilité attendue du modèle.

Raffiner : les animaux seront hébergés par groupes sociaux dans des volières conformes aux recommandations et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal, avec rotation du matériel pour renouveler l'intérêt des animaux. Le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations. L'imagerie IRM/TEP sera effectuée de manière simultanée, au cours d'une même anesthésie. Un traitement anti-inflammatoire sera administré pour éviter l'aggravation rapide des symptômes et l'atteinte précoce d'un point limite.

11588 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie incurable qui conduit à une paralysie par disparition des neurones commandant les muscles. La plupart des études se sont focalisées sur les périodes symptomatiques ou pré-symptomatiques et non pas sur les mécanismes initiaux conduisant fort probablement à la survenue de la maladie. Dans le présent projet, nous souhaitons étudier la SLA bien avant qu'elle ne s'exprime au niveau des réseaux moteurs de la moelle épinière

de souris. Nous pensons mettre en évidence des anomalies lors du développement de ces réseaux chez la souris Fus Δ NLS qui développe les symptômes de la SLA humaine. Un développement anormal du réseau moteur pourrait ainsi avoir des conséquences tardives conduisant à la dégénérescence des motoneurons pendant la vie adulte et à la paralysie fatale chez les patients SLA. Notre projet repose sur des expériences réalisées *in vitro* (analyse des inhibitions au niveau des motoneurons lombaires) qui nécessitent une validation *in vivo* dans un organisme entier (suivi du poids, tests de motricité), le remplacement intégral des animaux par des expériences *in vitro* étant impossible. Durant ce projet nous réaliserons un traitement pharmacologique de souris gestantes (bumétanide ou CLP-290) afin de potentialiser *in utero* le niveau des inhibitions des motoneurons des fœtus. Nous regarderons ensuite les effets de ce traitement prénatal sur le devenir des animaux adultes. Le traitement des souris au CLP-290 n'est pas décrit dans la littérature comme dommageable pour les animaux. Nous vérifierons les éventuels dommages causés à la femelle gestante et/ou aux animaux en gestation et mettrons en balance ces dommages (peu probables) avec les bénéfices attendus. Le nombre d'animaux requis sera limité au maximum en veillant tout de même à pouvoir réaliser des tests statistiques en fin d'expérience sur un échantillonnage correct. Au total 1896 souris seront nécessaires pour un projet de 5 années. Des mesures seront prises pour soulager la souffrance animale (mise en place de soins, interruption ou report de la procédure, euthanasie de l'animal) si les points limites sont atteints. Les conditions d'hébergement seront continuellement raffinées en veillant au bien-être animal au quotidien, par le biais d'enrichissement (tunnels polycarbonate) et de suivi attentif par du personnel compétent et qualifié, weekend compris. Les conseils d'un vétérinaire ou de la Structure du Bien Etre Animal (SBEA) seront toujours écoutés et le plan expérimental sera également raffiné en utilisant au mieux les animaux, en ne réalisant pas d'expériences superflues et en veillant à ce que les traitements proposés soient non-toxiques et renseignés. Dans son ensemble, notre projet basé sur le respect de la règle des 3R, constituera un premier pas vers de nouvelles stratégies de recherche qui seront essentielles pour diagnostiquer la SLA à des stades précoces.

11589 L'asthme allergique est une maladie inflammatoire des bronches, liée à l'inhalation d'allergènes qui débute essentiellement avant l'âge de 20 ans. Les allergènes de l'environnement sont plus fréquemment en cause que les allergènes alimentaires. En France, l'asthme toutes causes confondues, touche environ 6 à 7% de la population et est à l'origine de 1000 décès par an.

Le but de ce projet est d'étudier et de comprendre le rôle des cytokines, récepteurs et des voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte lors du développement de l'asthme allergique chez la souris induit par HDM (acariens), OVA (ovalbumine), papaïne (protéase à cystéine mimant les allergènes tels que les excréments d'acariens), Birch Pollen (pollen de Bouleau), *Alternaria alternata* (champignon microscopique) ou *Aspergillus fumigatus* (champignon microscopique). Dans ces modèles d'inflammation pulmonaire, les animaux vont développer une maladie respiratoire qui mime les symptômes présents chez les patients atteints d'asthme. L'asthme allergique se caractérise chez l'animal par un afflux cellulaire dans les poumons principalement des éosinophiles. Plusieurs modèles murins d'asthme allergique permettent d'étudier la pathologie, de comprendre les mécanismes sous-jacents et d'étudier les potentielles approches thérapeutiques à l'aide de souris déficientes pour les gènes correspondants. Les animaux déficients utilisés ne présentent pas de phénotype dommageable.

Ce projet s'inscrit dans la continuité d'un projet qui a déjà fait l'objet d'une évaluation pour le modèle d'asthme induit par HDM, OVA ou papaïne et fera l'objet de nouvelles procédures avec d'autres allergènes de l'environnement : Birch Pollen, *Alternaria alternata* ou *Aspergillus fumigatus*. Ce projet s'inscrit également dans un projet régional.

Les études dernièrement réalisées nous ont permis de mettre en évidence une partie du mécanisme d'induction de l'asthme allergique. La totalité du cheminement immunologique n'étant pas élucidé, il est nécessaire de continuer les expérimentations.

La compréhension de ces mécanismes permettra par la suite l'élaboration et l'étude de nouvelles pistes thérapeutiques.

Dans un premier temps, nous étudierons les différentes voies de signalisation de l'asthme allergique dans différents modèles d'asthme mis au point au laboratoire. Les souris vont recevoir à des temps précis des allergènes respiratoires et vont développer une insuffisance respiratoire spécifique de la pathologie, liée à un afflux de cellules dans les tissus pulmonaires. Au cours de l'expérimentation, les animaux ne vont pas perdre de poids et vont développer une légère gêne respiratoire. Les animaux seront ensuite mis à mort pour étudier différents paramètres inflammatoires, immunologiques et histologique dans les poumons (Partie 1).

Dans un second temps, les modèles mis en place seront proposés au client correspondant à la phase préclinique dans le développement de médicaments à visée thérapeutique. Cette étape permettra l'étude de l'action des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur. Ce projet aura pour but final de tester de nouveaux médicaments (Partie 2).

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 sauvage ou génétiquement modifiée. L'administration des allergènes à l'animal se fait par voie intra-nasale ou intra-péritonéale sous anesthésie générale afin de minimiser les situations douloureuses et stressantes.

Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation va dépendre des résultats obtenus et du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 65 études, soit 7566 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur et le stress au moment de l'expérimentation.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

11590 L'objet de cette demande d'autorisation de projet est d'étudier le rôle dans la perception de la douleur chez la souris, de mutations qui ont été identifiées comme impliquées dans les syndromes douloureux chroniques. Ces mutations sont présentes dans deux gènes voisins, et causent des douleurs intenses et spontanées telles que des sensations de brûlure et de démangeaisons au niveau des bras et des jambes. Jusqu'à maintenant les traitements prescrits aux patients restent très peu efficaces, ce qui nécessite d'effectuer des recherches plus avancées dans le but de mieux comprendre l'effet de ces mutations sur la nociception. La grande similarité entre les systèmes nerveux qui contrôlent la douleur chez la souris et chez l'homme fait du modèle souris un modèle idéal pour l'étude de ces maladies et pour comprendre les phénomènes biologiques qui y sont associés.

Remplacement

Dans le but de remplacer l'utilisation des souris, des méthodes alternatives ont été effectuées antérieurement et ont montré que ces mutations induisent un fonctionnement trop important des protéines codées par ces gènes. Ceci suggère que ces protéines mutées qui fonctionnent de manière excessive sont responsables des hypersensibilités chez les malades. Et maintenant pour aller plus loin, les capacités sensorielles ne peuvent pas être évaluées seulement par des études *in vitro*, mais nécessitent d'être évaluées dans des modèles de souris, ce qui rend le remplacement par une méthode alternative inutile à notre stade.

Réduction

Nous utiliserons 1656 souris au total. Cet effectif est approprié pour les études comportementales sur les souris mutées pour ces deux gènes et est suffisant pour montrer une différence statistique entre les groupes mutés et non mutés, si elle existe. En effet ce nombre est calculé pour détecter une différence de 20% avec une variation vers augmentation de la sensibilité douloureuse, et les expériences effectuées dans deux cohortes indépendantes afin de vérifier la reproductibilité des résultats de ces expériences de comportement. Pour minimiser le nombre de souris utilisées, les différents tests seront réalisés sur les mêmes souris.

Raffinement

La souris est de nos jours le modèle de choix largement utilisé pour l'évaluation des mutations humaines dans des modèles de rongeurs. La création de souris mutantes par le nouveau système génétique qu'on utilise est plus avancée chez la souris que chez le rat, et notre projet est financé par un contrat européen pour la création des mutations chez la souris.

Le bien-être des souris sera assuré tout au long de l'étude avec un suivi régulier de la boisson, la nourriture et de l'état de ces souris. Le phénotype de ces souris mutantes n'est pas encore connu puisque leur étude n'a pas été publiée jusqu'à présent, cependant afin d'éviter toute souffrance inutile, les souris feront l'objet d'un suivi rapproché et des points limites éthiques sont définis. Les animaux seront euthanasiés en cas d'une perte de poids supérieure à 20% et/ou de critères de souffrance importante.

11591 Les personnes soignées pour des pathologies graves comme un traumatisme crânien sévère ou un sepsis sont susceptibles de développer des pneumonies (infections nosocomiales secondaires) mais ont aussi un risque de cancer à long terme augmenté en raison d'une inflammation initiale des poumons qui modifient les flores bactériennes de contact (ou microbiome) et diminuent les capacités des cellules immunitaires, notamment muqueuses. Le déséquilibre entre le microbiome respiratoire stressé par l'inflammation et la paralysie immunitaire observée chez ces patients (dite « immunodépression post-critique ») dure plusieurs mois. Après une réponse inflammatoire, la restauration d'une immunité muqueuse fonctionnelle pourrait permettre de restaurer une homéostasie pulmonaire et ainsi prévenir les infections respiratoires. A ce jour, aucun traitement ne permet d'atteindre cet objectif.

Il est maintenant reconnu que le microbiome régule la maturation du système immunitaire. Les souris de laboratoire (pathogen free) ont un système immunitaire dit « immature », proche de celui d'un nouveau-né. L'acquisition d'un microbiome normal par ces souris permet la maturation complète du système immunitaire muqueux. Notre hypothèse est que les modifications du microbiome respiratoire induites par le stress inflammatoire sont responsables d'une maturation anormale des cellules immunitaires, conduisant à l'immunodépression post-critique. Notre projet a ainsi pour but de caractériser les causes et les conséquences des altérations de la composition et l'activité métabolique du microbiote respiratoire après inflammation.

Ce projet se déroulera en 2 grandes étapes : une 1ère étape qui est une étape de mise au point permettant de valider le modèle de souris décontaminées à l'aide d'antibiotiques nécessaire à la suite du projet. La 2ème étape évaluera l'influence du microbiote de patients hospitalisés en réanimation ayant subi une inflammation aiguë (traumatisme crânien ou sepsis) sur la maturation de l'immunité muqueuse de souris décontaminées à l'aide d'un modèle de transfert de microbiote respiratoire.

Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons 440 souris femelles C57Bl/6.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'étude de l'impact du traumatisme crânien et du sepsis sur le microbiote respiratoire ne peut s'effectuer que dans un organisme entier. Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Enfin, le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude avec une évaluation quotidienne des signes généraux. Une grille d'appréciation a été mise en place afin d'obtenir l'instauration de points limites pertinents et précoces et d'ainsi minimiser au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des souris et d'obtenir les informations pertinentes à moindre coût en termes de bien-être animal. Les souris seront conservées dans des cages

adaptées avec enrichissement et accès libre à l'eau et à la nourriture et des mesures adaptées en termes d'anesthésie et d'analgésie seront mises en place au cours des différentes procédures réalisées.

11592 A l'heure actuelle, on pense que les pathologies neurodéveloppementales telles que l'autisme ou l'épilepsie sont dues en partie à des facteurs génétiques mais il reste encore à les caractériser et à préciser leurs rôles. Dans ce domaine l'utilisation de lignée de souris transgénique c'est-à-dire possédant la même mutation sur un gène impliqué dans les troubles du développement cérébral chez l'homme est un outil indispensable pour faire avancer la recherche.

Au sein de notre laboratoire, nous travaillons sur un gène de susceptibilité lié à l'épilepsie : Prickle2. Des mutations du gène Prickle2 sont à l'origine d'une maladie rare (1/1.000.000) appelée « progressive myoclonic epilepsy type 5 » ou encore « épilepsie myoclonique progressive de type 5, EPM5 », sans que l'on connaisse les bases moléculaires et cellulaires de cette pathologie.

Si l'EPM5 est une maladie très rare, l'épilepsie est le résultat d'une activation survenant subitement, de manière simultanée et anormalement soutenue, d'un nombre très important de neurones du cerveau. Elle peut être associée à des myoclonies qui sont des secousses musculaires isolées survenant brièvement des deux côtés du corps de manière symétrique. En France, 0,6 à 0,7 % de la population est concernée et dans 75 % des cas, la maladie s'est installée avant 18 ans (OMS). Il est donc essentiel d'identifier et de classer les origines moléculaires des différentes formes d'épilepsie, ainsi que leur évolution lors du développement.

Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés aux troubles du développement du cerveau caractéristique de ces pathologies, l'étude chez l'animal est indispensable. Ce projet vise à créer et modéliser des lignées transgéniques présentant une délétion conditionnelle de ce gène (lignée « cKO Prickle2 »), uniquement dans certaines régions du cerveau et à des stades de développement restreints, afin d'identifier la nature exacte des éventuels troubles de développement cérébral lié à l'épilepsie. Pour créer des souris dont le gène Prickle2 est inactivé dans un tissu spécifique nous utilisons le système Cre-lox. Dans ce système le génome de souris dites « Cre » a été modifié afin d'exprimer la recombinaison Cre. Cette enzyme est capable d'exciser des fragments d'ADN situés entre deux séquences particulières d'ADN : les sites « loxP ». En croisant les souris « Prickle2-loxP » avec les souris « Cre » on obtiendra des souris chez lesquelles l'enzyme Cre excise le gène de l'ADN Prickle2. Afin de contrôler la délétion du gène Prickle2 dans l'espace-temps on utilise un promoteur spécifique de la Cre recombinaison.

Notre projet visera à élucider les bases moléculaires de l'EPM5, à la fois lors du développement du système nerveux central mais nous évalueront également le rôle de Prickle2 dans la fonction adulte du cerveau. Notre projet repose sur une approche intégrative nécessitant le fonctionnement du cerveau dans son intégrité ce qui reste encore impossible à modéliser. Il est probable que l'étude de cette protéine neuronale permettra d'aborder de nouveaux mécanismes physiopathologiques, qui pourront sans doute être transposables aux formes communes d'épilepsie. Cette étude pourra aussi nous guider vers le développement de nouvelles cibles pharmacologiques.

Règle des 3R.

Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. Pour autant, le seul modèle animal de l'épilepsie, suffisamment caractérisé à ce jour, reste le modèle murin transgénique. Par conséquent, nous pensons qu'il n'existe pas de remplacement disponible à notre modèle expérimental qui permettrait d'atteindre les objectifs scientifiques du travail proposé.

Raffiner : Le système Cre-loxP permet de réduire les effets défavorables résultant de l'ablation d'un gène et ainsi minimiser les effets négatifs sur le bien-être animal et limiter les décès pouvant être associés aux animaux knock-out (KO). En effet, la génération d'un animal KO consiste à « supprimer » un gène dans l'ensemble de l'organisme de l'individu. L'impact de cette altération dès embryogenèse et sur la totalité des organes peut entraîner des anomalies sévères pouvant conduire

à des décès prénataux ou postnataux. Avec le système Cre-lox, la mutation du gène étudié peut être dirigée à la fois dans l'espace, c'est-à-dire dans un organe ou une structure spécifique de l'organisme, et dans le temps, c'est à dire à un stade particulier du développement de l'individu. Pour supprimer l'angoisse ou la détresse des animaux au cours de la procédure, les animaux sont élevés en cage collective enrichie et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place

Réduire : Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, un minimum de 3 et 6 trios de souris (1 mâle et 2 femelles par cage) seront utilisés pour produire la génération de souris désirée. Ensuite, pour maintenir la lignée, seulement 2 trios seront hébergés en continu et cela sur 5 ans. Nous avons estimé que le nombre total d'animaux nécessaire à la création d'une seule lignée de souris transgénique est de 129 souris plus 120 souris pour maintenir la lignée sur 5 ans

Pour deux lignées de souris transgéniques, le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet est de 498 animaux

11593 Les situations de choc, hémorragiques ou septiques, partagent des mécanismes physiopathologiques communs (mise en place de processus inflammatoires, défaillances cardiovasculaires, hypoperfusion des organes périphériques...) qui nécessitent une prise en charge rapide et adaptée. Elles sont toutes deux associées à une morbi-mortalité importante avec un coût pour la société qui croit chaque année. Malheureusement, les traitements disponibles sont très limités et visent principalement les symptômes. Toutes les études récentes se sont soldées par des échecs, on se trouve en face d'une impasse thérapeutique. Il devient donc urgent de développer de nouvelles stratégies visant de nouvelles cibles. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet. Nous avons développé une approche visant à stimuler la O-GlcNAcylation dans le choc hémorragique. La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle responsable de la survie cellulaire qui joue un rôle majeur dans la réponse au stress et la survie cellulaire. Dans l'équipe, nous visons à augmenter de manière très précoce les niveaux de O-GlcNAc, associées à une réduction importante des marqueurs de stress, à une amélioration de la fonction cardiovasculaire et une forte réduction de la mortalité dans les deux types de choc, ce qui démontre que la stimulation de la O-GlcNAcylation présente un potentiel thérapeutique important pour la survie des patients afin de limiter les atteintes associées aux chocs. L'approche que nous développons dans cette étude pourrait être utilisée dans les situations aiguës par injection intramusculaire ou intraveineuse, mais aussi en traitement préventif du développement du choc suite à une blessure ouverte, ou une fois le choc installé permettant ainsi de réduire la morbi-mortalité associée au choc hémorragique.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés lors des expériences sera réduit au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Le nombre d'animaux est fixé à 15 par condition. Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin d'optimiser au maximum notre étude, nous apporterons un soin particulier à raffiner nos techniques dans le but de limiter le nombre d'animaux par une meilleure reproductibilité et diminuer la mortalité dans la suite des études. Afin de prévenir l'angoisse, l'inconfort, le stress, les souffrances et la douleur associés, et de ne pas altérer les résultats de l'étude, les expériences seront réalisées sur des animaux anesthésiés ; une médication adaptée sera administrée et des points limites seront définis, au-delà desquels les animaux seront retirés de l'étude (signes de souffrances importants par exemple). Plusieurs investigations seront réalisées sur les mêmes animaux, afin de limiter la multiplication de groupes expérimentaux. En fin d'expérience, le sang sera prélevé à l'artère fémorale des animaux anesthésiés, qui seront ensuite mis à mort en vue de prélever différents tissus.

Remplacer : Ce modèle n'est ici pas remplaçable au vu de la complexité des réponses et de leurs intégrations ainsi que des interactions avec et entre les différents organes.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 366 rats.

11594 La cornée est le tissu le plus densément innervé de l'organisme. Les nerfs cornéens assurent la sensibilité proprioceptive (sensation de toucher) et nociceptive (sensation de douleur et de variation

de température) et jouent un rôle important dans le réflexe de clignement, de production de larmes et de cicatrisation cornéenne.

De nombreuses études ont mis en évidence le lien entre la dysfonction de l'innervation cornéenne et l'apparition d'atteintes cornéennes. Ces atteintes vont de la simple sécheresse oculaire jusqu'à des pathologies cécitantes comme la kératite neurotrophique. Environ 285 millions de personnes dans le monde souffrent de déficience visuelle sévère, dont 10% liée à une atteinte cornéenne. De même, parmi les 40 millions personnes aveugles dans le monde, plus de 1.5 millions sont atteints de pathologies cornéennes. L'atteinte de l'innervation cornéenne est fréquemment responsable des pathologies cornéennes entraînant une baisse importante d'acuité visuelle. Ces atteintes peuvent être secondaires à de nombreuses pathologies infectieuses ou inflammatoires de la cornée. Aucun traitement n'est actuellement disponible en routine malgré le nombre important de patients concernés.

Dans ce projet, nous étudierons l'effet d'une molécule pharmacologique sur la régénération des axones cornéens sur des souris transgéniques après lésion de la cornée. Au total, 90 souris seront utilisées dans ce projet. L'utilisation de l'animal est indispensable dans le projet car il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant de suivre les mécanismes de régénération de l'innervation cornéenne. Les lésions de la cornée s'effectueront sous anesthésie générale et la cornée sera en plus anesthésiée localement. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux auront à leur disposition des carrés de cellulose, des bâtons à ronger, un tunnel et une maisonnette. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

11595 L'objectif de cette saisine est de nous permettre de former les personnes désireuses de le faire aux techniques expérimentales de transgénèses et de cryoconservations chez le rat et la souris.

Ceci pour plusieurs raisons : Etant un institut pilote et certifié pour nos activités, nous souhaitons transmettre nos savoir-faire et connaissances, partager nos expériences et aussi permettre par la formation d'améliorer le bien-être animal et le raffinement des techniques qui seront mise en œuvre par d'autres membres de la communauté scientifique sur ce sujet.

Ces formations sont destinées aux techniciens, ingénieurs, chercheurs et étudiants.

Nous pourrions assurer la formation sur les points suivants :

- Superovulation et Synchronisation (injections en intra péritonéale) (rats et souris)
- Transgénèse (rats et souris)
- Anesthésie et chirurgie de transfert d'embryons aux différents stades préimplantatoires (rats et souris)
- Ponction de sperme par microchirurgie (rats et souris)
- Fécondation *In vitro*, FIV (Souris)
- Congélation d'embryon (rats et souris)
- Congélation de sperme (Souris)
- Insémination artificielle (Rats)

Les lignées transgéniques générées servent à mieux comprendre le processus de développement des maladies humaines, servent pour la recherche fondamentale et vont également permettre de tester des médicaments et de valider (ou d'invalider) des cibles thérapeutiques.

A l'heure actuelle de nos connaissances, nous ne pouvons pas nous passer du recours aux animaux pour ces différentes études, mais la réduction du nombre d'animaux utilisés et leur bien-être est une préoccupation permanente pour nous.

L'objectif ici, au travers de la formation, est :

- Limiter le nombre d'animaux utilisés (les embryons sont produits par super-ovulation des femelles. Cette technique permet de réduire le nombre de femelles utilisées).

- et de réaliser des procédures parfaitement maîtrisées et de plus en plus raffinées pour le bien-être des animaux.

Dans ce projet, ne seront commandés dans des établissements éleveurs que les animaux que nous n'avons pas en stock pour les besoins de la formation.

Les autres animaux utilisés proviendront du reclassement d'autres études de nos activités quotidiennes où ils étaient voués à être sacrifiés, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux.

Notre établissement envisage de réaliser une dizaine de formations par an, soit environ 500 rats et 500 souris par an (5 000 animaux sur la durée du projet).

Le nombre d'animaux utilisés dépend directement du type de formation souhaitée.

Par exemple, pour la transgénèse, la FIV, la congélation d'embryons, il nous faudra une vingtaine d'animaux. Tandis que pour les ponctions de sperme, la congélation de sperme, la chirurgie, il nous faudra environ 5 animaux.

11596 Les troubles envahissants du développement, dont les troubles du spectre autistique (TSA) sont associés à des dysfonctionnements du comportement, de la cognition et de la perception. Les études épidémiologiques ont apporté des preuves tangibles que l'infection prénatale est associée à un risque accru de développer des troubles psychiatriques et neurologiques, dont en grande partie la schizophrénie, l'autisme et la paralysie cérébrale. L'objectif du projet est d'utiliser un modèle animal environnemental de l'autisme (acide valproïque (VPA) : souris C57BL/6J) pour caractériser les dysfonctions dans les ganglions de la base notamment impliqués dans la motricité et la gestion des émotions et de disséquer les réseaux neuronaux impliqués dans ce trouble au niveau anatomique et électrophysiologique.

La souris, et plus spécifiquement celle de race C57BL/6J est très utilisée comme modèle animal de troubles neurologiques et psychiatriques. Un intérêt particulier se portera sur les interneurons parvalbumine (PV) qui sont en faible pourcentage dans le striatum. Nous utiliserons la lignée de souris PV-CRE qui exprime la CRE recombinase dans les neurones PV ce qui facilite leur identification. Cette lignée de souris ne présente aucun phénotype délétère. Les rongeurs sont à ce jour les espèces modèles de petite taille ayant un système nerveux moteur proche de l'Homme.

Afin d'être en conformité aux règles 3R :

1) Remplacer : Le projet vise à caractériser les dysfonctionnements du réseau des ganglions de la base composée de plusieurs régions cérébrales. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier.

2) Réduire : (i) nous utiliserons des protocoles expérimentaux utilisés en routine dans le laboratoire qui ne nécessitent pas d'optimisation, (ii) nous utiliserons les mâles et les femelles pour notre étude et collecterons le maximum d'échantillons possible afin d'extraire le plus d'information par animal sacrifié, (iii) Un calcul de puissance statistique a été utilisé pour minimiser le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des données significatives.

3) Raffiner : La lignée de souris PV-CRE ne présente aucun phénotype délétère. Toutes les souffrances liées aux chirurgies seront soulagées par les molécules les plus adaptées. Les animaux seront hébergés par sexe et fratrie pour éviter l'isolement et ainsi réduire leur stress. Pour les animaux nécessaires à la reproduction nous utiliserons des souris PV-CRE homozygotes et des souris C57BL6J qui donneront des descendants PV-CRE hétérozygotes (100%). Par conséquent nous avons besoin pour la reproduction de 50 femelles par an composés de souris C57bl6J et de souris PV-CRE homozygotes. Pour les expériences, nous utiliserons les descendants qui seront tous de génotype PV-CRE hétérozygote (100% de la portée) : 2 (groupes traitement : SALINE et VPA) x 25 (animaux/groupe) x 2 (sexes : M et F) = 100 descendants par an. Soit un total de 150 animaux par an, si on estime à 10% le nombre d'animaux surnuméraires qui seront inclus dans les groupes expérimentaux soit 10 animaux par an. La durée du projet est de 3 ans il nous faut donc au total 480 animaux (450 + 30 surnuméraires). Alors les accouplements seront arrêtés.

Ainsi le nombre total de souris utilisées pour cette étude est de 480. Nous émettons l'hypothèse que cette caractérisation peut ouvrir une nouvelle voie dans le diagnostic quantitatif de ces troubles,

et potentiellement identifier les réseaux neuronaux communs qui sous-tendent les troubles moteurs et cognitifs caractéristiques de ces pathologies.

11597 La maladie d'Alzheimer (MA), forme la plus commune de démence chez les personnes âgées, représente un enjeu majeur pour notre société. La MA est un syndrome neurodégénératif associé à une perte progressive des fonctions cognitives. La MA est corrélée à des changements histologiques incluant des plaques amyloïdes, des dégénérescences neurofibrillaires et la mort neuronale qui conduisent inévitablement à la perte de mémoire et aux déficits dans la transmission synaptique. Le peptide bêta-amyloïde (A-bêta), provient de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), et la protéine tau sont les candidats principaux de cette maladie. Les premières lésions apparaissent dans une zone du cerveau impliquée dans l'apprentissage et la mémoire, l'hippocampe. L'apprentissage et la mémoire reposent sur la plasticité des circuits de notre cerveau, c'est-à-dire la capacité des neurones à modifier de façon durable l'efficacité de leur transmission synaptique. L'expression de l'APP dans les neurones de l'hippocampe entraîne des modifications de cette plasticité, altérant l'acquisition et la consolidation de la mémoire chez les personnes souffrant de la maladie d'Alzheimer.

Dans ce projet, nous proposons d'examiner comment l'APP et tau affectent la transmission synaptique et ultimement la plasticité synaptique et d'étudier l'efficacité de molécules en développement sur ces altérations. Pour cela, nous utiliserons trois modèles de souris transgéniques qui miment la MA. Ces modèles de souris transgéniques présentent un phénotype non dommageable à l'âge auquel nous les utiliserons et miment au mieux la MA puisque ces souris développent non seulement des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires mais aussi des déficits synaptiques et cognitifs et constituent donc un bon modèle pour l'évaluation de candidats thérapeutiques. Lors de cette étude, nous testerons l'efficacité de composés en développement, administrés par voie orale sur les modifications de la plasticité synaptique. Notre projet scientifique devrait permettre de mieux comprendre les changements moléculaires de la MA avec des mécanismes moléculaires et synaptiques qui sont à la base des phénomènes de mémoire et d'apprentissage et ainsi d'apporter des informations importantes pour le développement de stratégies thérapeutiques futures. Nous utiliserons 480 souris, à l'âge adulte.

Ce projet se justifie pleinement d'un point de vue scientifique et sera réalisé dans le respect éthique de la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement) :

-remplacement : l'étude du système nerveux, de par sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et ainsi aboutir au traitement de ses pathologies et au développement de nouvelles thérapies.

Nos expérimentations seront réalisées chez la souris, car il existe de nombreux modèles transgéniques pour cette pathologie, utilisés communément par la communauté scientifique nationale et internationale pour la recherche fondamentale et l'étude de l'effet de composés. Ces rongeurs, de petite taille et d'élevage facile, possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

-réduction : le nombre de souris a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec un logiciel de statistiques scientifiques. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non. En cas de distribution normale, nous utiliserons des tests paramétriques (t-test pour comparer 2 échantillons, ANOVA pour comparer n échantillons). En cas de distribution non normale, nous utiliserons des tests non paramétriques (test de Mann-Whitney ou de Kruskal Wallis). Le nombre d'animaux sera éventuellement réduit si un effet statistique est observé avec un nombre plus faible d'animaux.

-raffinement : les animaux seront hébergés dans des cages avec portoirs ventilés. Boisson et nourriture seront disponibles *ad libitum*. Avant les expériences, les animaux seront acclimatés pendant une période d'une semaine. Au cours de cette période d'acclimatation, les animaux seront manipulés, afin de les habituer à l'expérimentateur. Dès que l'administration orale des composés débutera, les animaux seront pesés quotidiennement afin de suivre l'évolution de leur poids. Le bien-être des animaux sera attentivement suivi quotidiennement par l'établissement de fiches d'évaluations, permettant ainsi de détecter toute souffrance, angoisse ou signes de stress pour les animaux. Ces fiches permettront par ailleurs de déterminer des points limites précoces et adaptés. En cas de souffrance de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée. Si les signes de souffrance persistent, les animaux seront euthanasiés.

11598 L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants ; il participe au développement de l'organisme et à la réparation tissulaire. Toutefois, le dérèglement de ce processus est la cause ou accompagne de nombreuses pathologies, comme la cancérogenèse et aussi certaines formes de cécité (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age ou les rétinopathies diabétiques). A ce jour, les traitements ciblent spécifiquement le facteur VEGF (Vascular endothelial growth factor) décrit comme le principal facteur stimulant l'angiogenèse. Cependant, une pléthore d'études démontre le rôle important d'autres molécules contrôlant l'angiogenèse, notamment des molécules impliquées dans le développement du système nerveux central.

Notre projet vise à décrypter le rôle *in vivo* d'une de ces molécules impliquées dans le développement du SNC, la Nétrine-1 pendant l'angiogenèse développementale et le maintien des structures vasculaires chez l'adulte. Le rôle de la Nétrine-1 durant l'angiogenèse a principalement été décrit grâce à des expériences *in vitro*. Ces résultats sont controversés puisque certaines études suggèrent un rôle de stimulation de la formation des vaisseaux tandis que d'autres un rôle d'inhibition de la formation des vaisseaux. Concernant son rôle chez l'adulte, rien n'est encore clairement décrit.

Afin de clarifier le rôle de la Nétrine-1 *in vivo*, nous utiliserons le modèle de la rétine murine pour 2 raisons principales. La souris présente l'avantage d'être très similaire à l'homme que ce soit anatomiquement, physiologiquement et génétiquement. En effet plus de 98% de son génome est identique à celui de l'homme. D'autre part, l'organisation et le développement du système vasculaire de la rétine murine sont très bien décrits faisant de cette dernière un modèle de choix pour notre étude. Ainsi, nous pourrions comparer le système vasculaire de ces souris mutantes avec celui de souris non mutantes.

Afin de déterminer le rôle de la Nétrine-1 dans le maintien du système vasculaire, nous analyserons 4 lignées de souris transgéniques pour le gène étudié. Nous utiliserons 2 lignées de souris permettant d'étudier les conséquences de l'absence du gène de la Nétrine-1 dans des régions spécifiques de la rétine. De manière complémentaire, nous analyserons aussi les conséquences de la surexpression de la forme humaine de la Nétrine-1 dans des régions spécifiques de la rétine grâce à 2 autres lignées de souris.

Le nombre total de souris utilisées dans ce projet sera de 160 pour 5 ans.

Dans le cadre de ce projet, nous appliquerons la règle des 3R. L'utilisation d'un modèle murin est nécessaire pour étudier l'homéostasie du système vasculaire car seul un modèle *in vivo* permet d'avoir un système complexe. Dans un souci de réduction, nous utiliserons séparément les yeux d'un même animal pour différentes analyses. Cela nous permettra de diviser par 2 le nombre d'animaux utilisés. L'inactivation ou la sur expression de la Nétrine-1 chez l'adulte n'est pas l'origine d'effets délétères pour les animaux, ainsi durant l'expérience, les animaux seront hébergés dans des conditions normales puisque nous savons que ces animaux ne présentent pas de dégradation de leur état général.

Ce projet devrait nous permettre de définir clairement le rôle de la Nétrine-1 dans le maintien de l'homéostasie vasculaire et d'ouvrir des perspectives d'études vers des pathologies comme le cancer (pathologie où l'on retrouve fréquemment des anomalies de la barrière vasculaire).

11599 La maladie de Parkinson (MP) est l'une des maladies neurodégénératives les plus courantes qui touche rien qu'en France plus de 150 000 personnes de plus de 65 ans et qui se caractérise par une perte d'une population de neurones, ceux à dopamine. C'est un réseau de structures cérébrales, appelés ganglions de la base (GB) qui contrôle l'exécution du mouvement volontaire et qui dysfonctionne dans la MP lorsque la dopamine vient à manquer dans le cerveau. Dans ce réseau, le cortex et les ganglions de la base jouent un rôle prédominant dans l'exécution et l'arrêt des actions motrices et l'apprentissage moteur, mais le rôle exact joué par la dopamine reste mal compris. Pour étudier l'action de la dopamine au niveau du cortex et des ganglions de la base, nous avons besoin de stimuler spécifiquement et de façon contrôlée les connections dopaminergiques entre les ganglions de la base et le cortex, et de plus il faut que cette stimulation ne soit faite que dans les neurones à dopamine. Cette stimulation se fera par la technique d'optogénétique (technique qui permet de manipuler l'activité électrique des neurones grâce à des molécules sensibles à la lumière). Nous utiliserons donc une souris transgénique (la lignée COP4) qui exprime une de ces molécules capables d'être manipulées par la lumière appelée channelrhodopsine (ChR2). Pour que cette molécule ne soit présente que dans les neurones à dopamine, nous devons la croiser avec une souris qui permet de sélectionner cette expression dans les neurones à dopamine, la souris Dat Cre.

Ce projet concerne donc la création d'une lignée de souris transgénique par croisement de deux lignées existantes. Nous vérifierons que ces modifications géniques ne provoquent pas de phénotype nocif, dans les croisements générés à partir de ces 2 lignées. La création de ces croisements nécessitera au maximum 130 animaux. Pour le respect de la règle des 3R, l'élevage sera minimisé le plus possible pour ne produire que les animaux nécessaires. Si le constat d'un phénotype nocif est fait, les mesures spécifiques seront prises pour le bien être de ces animaux. Il n'existe pas pour l'heure de méthodes alternatives pour répondre aux questions scientifiques que permettra d'aborder l'utilisation des croisements générés dans ce projet.

11600 L'épithélium intestinal a un rôle de barrière entre l'environnement intérieur et extérieur. Il se renouvelle en continu tout au long de la vie, lui permettant une adaptation rapide à l'environnement extérieur et aux pathologies. Les cellules souches se différencient en différents types cellulaires dont les cellules endocrines. Ces cellules, sécrètent de nombreuses hormones ayant des effets pléiotropes dont le contrôle de la prise alimentaire et la sécrétion d'insuline. Certaines hormones intestinales ont un rôle crucial dans les maladies métaboliques comme l'obésité et une des comorbidités associées : le diabète de type 2.

Des études ont montré une altération des concentrations plasmatiques des entérohormones chez les personnes obèses et/ou diabétiques. Nous avons montré une diminution de la densité des cellules entéroendocrines dans l'intestin de sujets obèses. Il a également été démontré que l'environnement nutritionnel pouvait moduler la densité des cellules entéroendocrines chez la souris. Ces études montrent que la densité des cellules entéroendocrines peut être modulée afin d'augmenter la sécrétion d'entérohormones.

Notre objectif est de comprendre comment les cellules endocrines de l'intestin sont modulées par les pathologies telles que l'obésité et le diabète de type 2 afin de proposer de nouvelles cibles permettant de stimuler la sécrétion endogène et régulée des hormones insulino-sécrétrices comme le GLP-1.

Chez l'Homme, nous avons montré que certains gènes des cellules entéroendocrines étaient différentiellement exprimés chez les sujets obèses et diabétiques comparés aux sujets obèses et non diabétiques. Nous cherchons maintenant à savoir comment ces gènes, identifiés chez l'Homme, sont modifiée au cours de la mise en place des maladies métaboliques. Dans le principe des 3R, le Remplacement par l'utilisation d'autres méthodes étant impossible pour induire les pathologies métaboliques, une approche *in vivo* chez la souris est donc nécessaire. Nous utilisons

un modèle de souris C57Bl6, fournis par des établissements agréés, recevant un régime riche en lipide et en fructose (HF/HF) afin d'induire une obésité puis un diabète. Nous utilisons comme contrôle des souris C57Bl6 recevant un régime contrôle (CD). De plus, nous nous demandons si le microbiote intestinal modifié au cours des maladies métaboliques est impliqué dans l'expression des gènes cibles. Nous réalisons donc des transferts de microbiote intestinal depuis des souris donneuses, ayant reçu un régime HF/HF ou CD, vers des souris receveuses recevant un régime HF/HF.

Certaines procédures de ce projet sont appliquées sur les mêmes groupes de souris, il y a ainsi respect du principe de Réduction du nombre des animaux.

Le respect du Raffinement des protocoles est assuré par : (1) enrichissement (coton, ou nids et/ou tunnels permettant l'escalade et la cache), acclimatation de 7 jours (2) protocoles de classe légère à modérée ne nécessitant pas d'anesthésie, (3) actes réalisés avec les meilleurs outils et par des personnes formées et habituées à les faire.

Nombre d'animaux expérimentés utilisé pour le projet : 240.

11601 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie rare dont la prévalence est de 15000-20000 nouveaux cas par an. Elle est caractérisée par une inflammation pulmonaire et une fibrose principalement localisée dans le tissu interstitiel du poumon. Ainsi altérés, les poumons ne parviennent plus à assurer correctement leur fonction respiratoire.

La cause de ces lésions fibrotiques et de la destruction progressive du tissu pulmonaire reste inconnue. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement spécifique et réellement efficace contre la FPI. Le traitement repose sur les glucocorticoïdes ou les immunosuppresseurs, mais ces molécules sont peu efficaces et n'empêchent pas le développement de la fibrose. C'est pourquoi l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou le rat WISTAR. Ces modèles animaux sont des mammifères suffisamment proches de l'Homme. Dans la majorité des cas ce qui est vrai pour le rat est aussi applicable pour l'Homme. De plus, nous partageons 95% de nos gènes avec la souris, ce qui en fait un modèle efficace pour la recherche. L'administration de la Bléomycine à l'animal se fait sous anesthésie générale afin de minimiser les situations douloureuses et stressantes. Ce modèle induit des douleurs inflammatoires aiguës à l'animal, liées au développement de la maladie pulmonaire. Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles qui sont requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études (5 études rat + 15 études souris), incluant au maximum 90 animaux, soit 1800 animaux au total (450 rats au maximum et 1350 souris au maximum).

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant la fibrose pulmonaire idiopathique. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

-Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

-Raffinement : Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien être et d'éviter au maximum leur douleur au moment de l'expérimentation.

-Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

11602 La neurofibromatose de type 1 est une maladie génétique caractérisée par l'apparition de multiples tumeurs bénignes, appelées neurofibromes, principalement au niveau de la peau (neurofibromes

cutanés). Cette maladie est causée par une mutation du gène Nf1 codant pour la neurofibromine. La quasi-totalité des patients atteints développent des neurofibromes cutanés localisés au niveau des terminaisons nerveuses dans la peau. Ils apparaissent typiquement après la puberté et leur nombre augmente graduellement à l'âge adulte causant de sévères malformations, des douleurs ainsi qu'une profonde détresse psychologique qui altèrent considérablement la qualité de vie des malades. A l'heure actuelle, mise à part l'exérèse chirurgicale, il n'existe aucun traitement pharmacologique permettant de réduire l'apparition de ces tumeurs. Ce projet repose sur l'utilisation d'une lignée transgénique de souris mutante pour le gène Nf1 qui reproduit fidèlement les symptômes de la maladie chez l'Homme et son évolution. Nous souhaitons dans un premier temps évaluer l'efficacité d'une nouvelle technique d'imagerie, l'échographie Doppler ultrarapide, pour détecter de manière précoce l'apparition des neurofibromes cutanés chez la souris. Dans un deuxième temps, nous proposons que la myosine non musculaire de type II (NMII), une protéine importante dans les phénomènes de migration et prolifération tumorale, soit une cible thérapeutique intéressante dans cette maladie. Ainsi, nous évaluerons l'effet d'un traitement local et chronique par un inhibiteur de la NMII sur le délai d'apparition, le nombre et la taille des neurofibromes chez la souris.

Remplacement : Ces études, impliquant la complexité d'un tissu, ne peuvent être conduites *in vitro*
Raffiner et réduire : Les procédures utilisées dans ce projet sont non-invasives et indolores. Les séances d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale. Tout signe de souffrance, stress, douleur ou angoisse sera soulagé avec des analgésiques et anti-inflammatoires. Le bien-être des animaux sera mesuré quotidiennement grâce à une échelle dédiée. Des points limites sont fixés a priori afin de garantir l'absence de souffrance des animaux, notamment due à une perte fonctionnelle causée par l'évolution de la maladie. Aux âges considérés (de 3 à 5 mois), les souris ne présentent pas de phénotype dommageable. Ce projet nécessite 36 souris pour une durée de 2 ans.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre le rôle de la NMII dans l'évolution de la neurofibromatose et permettront de valider l'échographie ultrarapide comme technique intéressante pour le diagnostic précoce des neurofibromes et ainsi d'améliorer considérablement la qualité de vie des patients

11603 Projet :

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par une inflammation chronique de la paroi du tube digestif, un déséquilibre de la flore intestinale (ou microbiote) et un défaut de la fonction de barrière intestinale. L'objectif général de ce projet est d'identifier et de comprendre les mécanismes permettant aux bactéries intestinales d'influencer la fonction de barrière intestinale, qui protège notre environnement intérieur. Nous nous sommes intéressés à des molécules impliquées dans la communication entre les bactéries. Ces molécules sont synthétisées par les bactéries et leur permettent d'adopter un comportement de groupe, en fonction de leur densité de population. Jusqu'ici, on ignorait si ce type de molécules était présent dans le microbiote de l'intestin. Notre équipe a récemment mis en évidence plusieurs molécules de ce type dans le microbiote intestinal humain, dont l'une est perdue chez les patients atteints de MICI en période de poussée inflammatoire. De façon intéressante, la présence de cette molécule est associée à un microbiote normal et son absence à un déséquilibre, suggérant des effets protecteurs sur le microbiote intestinal.

Nous proposons d'étudier l'impact de ces molécules de communication bactérienne sur la fonction de barrière intestinale. Dans une première étape, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de cellules épithéliales intestinales pour mesurer différents paramètres de la fonction de barrière. Nous avons montré que notre nouvelle molécule préserve les jonctions cellulaires et la fonction de barrière. Toutefois, les modèles cellulaires ne permettent pas de prendre en compte la complexité des interactions de l'épithélium intestinal avec l'environnement de la lumière du tube digestif et avec les compartiments du milieu intérieur comme le système immunitaire.

Notre projet a donc maintenant pour objectif d'étudier les effets de ces molécules bactériennes sur la perméabilité intestinale *in vivo* chez la souris. Des résultats préliminaires ont montré des effets bénéfiques sur la composition du microbiote intestinal, justifiant de poursuivre l'exploration de leurs effets sur la barrière intestinale *in vivo*. La confirmation *in vivo* que la molécule que nous avons identifiée est protectrice pour la fonction de barrière intestinale apportera des connaissances nouvelles sur les effets bénéfiques des interactions hôte/bactéries. C'est une étape indispensable qui permettra d'envisager une piste de traitement innovant pour réduire l'inflammation et restaurer un microbiote normal dans les MICI. Les souris recevront les molécules étudiées par voie orale pendant 3 jours consécutifs puis seront euthanasiées, sans avoir subi d'expérience entraînant souffrance ou angoisse, afin de prélever leur intestin et d'en évaluer la perméabilité.

Type d'animaux : Souris C57BL/6J commerciales (*mus musculus*).

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 216 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Une première partie du projet a impliqué une étude *in vitro*, réduisant drastiquement le nombre d'animaux utilisés au cours du projet. Toutefois, les modèles cellulaires ne permettent pas de prendre en compte la complexité des interactions de l'épithélium intestinal avec l'environnement de la lumière du tube digestif et avec les compartiments du milieu intérieur comme le système immunitaire. Un système vivant est donc nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le cadre de ce projet.

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

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

11604 L'incidence du cancer du rein et la mortalité associée se sont accrues au cours des dernières années. Malgré une détection plus précoce, l'évolution de la pathologie demeure incertaine et peut progresser rapidement, en particulier quand les patients développent des métastases ou acquièrent une résistance aux traitements. Les traitements actuellement disponibles reposent sur des molécules chimiques de la famille des anti-tyrosine kinases qui bloquent l'hyper-vascularisation tumorale. Cependant, leur action est limitée dans le temps, ce qui se traduit par des rechutes fréquentes. De nouveaux traitements tels que l'immunothérapie ou la combinaison de nouvelles molécules thérapeutiques font actuellement l'objet d'une recherche très active.

Ainsi, nous avons récemment identifié et caractérisé *in vitro* des combinaisons de molécules ciblant des enzymes importantes pour la survie des cellules cancéreuses rénales. Dans le cadre d'une étude préclinique, notre objectif est à présent de tester nos molécules directement sur des cultures de tissu issu de tumeurs du rein de patient après leur retrait par chirurgie. Nous prévoyons de collecter, sur une période de deux ans, une centaine de prélèvements. Cela nous permettra d'effectuer une étude statistique robuste prenant en compte les facteurs pronostiques connus de ces tumeurs et l'évolution des patients.

Le but de ce projet est de pérenniser ces tumeurs en les implantant dans des souris immuno-déficientes. Ainsi, l'efficacité des traitements pourraient ainsi être comparée à la fois sur ces modèles de souris et sur la culture organotypique. En effet, il est admis que les résultats obtenus *in vitro* sont rarement reproduits *in vivo*. Ici, nous souhaitons valider une nouvelle méthode qui, à terme, s'il y a une bonne concordance entre les résultats *in vitro* et *in vivo*, permettra de se passer complètement d'animaux pour ces tests d'efficacité.

Cette étude devrait permettre d'évaluer si la sensibilité de cultures organotypiques ou de modèles de souris porteuses des mêmes tumeurs de rein peut prédire la réponse clinique du patient. L'ultime but est de réaliser un test préclinique en temps réel permettant de guider le choix thérapeutique.

Le recours aux animaux est ici nécessaire pour valider notre approche *in vitro*. Nous utiliserons au maximum 600 rongeurs (souris) nés en captivité dans des élevages agréés. Ce nombre représente le minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences. La greffe de la tumeur est réalisée sous anesthésie gazeuse. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et nous interviendrons immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

Les animaux sont hébergés en groupe et en milieu enrichi de modules permettant d'améliorer leurs conditions de vie.

11605 L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'innocuité et l'efficacité thérapeutique d'un nouveau candidat-médicament développé pour le traitement des lipointoxications pulmonaires par hypoxie. La lipointoxication se définit notamment comme une concentration anormalement élevée ou diminuée de lipides, typiquement d'acides gras libres ou non estérifiés, de stérols, et l'on observe alors une dérégulation de l'homéostasie lipidique. Ce type d'anomalie a été retrouvé au niveau de cellules pulmonaires humaines dans la mucoviscidose et les Broncho-Pneumopathies Chroniques Obstrucitives (BPCO). Après des études préliminaires d'efficacité et de toxicité menées *in vitro*, le candidat médicament sera tout d'abord formulé de sorte à pouvoir être administré par voie inhalée chez le rat sain (dispositif « Penn Century »), et des doses ascendantes seront testées afin d'évaluer la toxicité potentielle. Dans un second temps, en fonction des résultats obtenus précédemment, ses effets curatifs potentiels seront estimés dans un modèle présentant des caractéristiques des lipointoxications qui est le modèle de syndrome hépato-pulmonaire, obtenu chez le rat. Les dommages attendus sont liés à l'apparition du syndrome hépatopulmonaire avec hypertension portale et éventuellement développement d'une cirrhose. Un suivi très strict des animaux et la mise en place de points limites permettra d'anticiper le cas échéant, toute douleur ou souffrance des animaux.

Le nombre d'animaux requis sera de 78 animaux (rats).

Ces travaux seront menés conformément à la règle des 3R avec un nombre de rats mis en œuvre réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations. Par ailleurs, les animaux seront manipulés par du personnel formé et entraîné, avec une surveillance quotidienne et des explorations d'imagerie non invasive par scintigraphie, réalisées sous anesthésie. L'ensemble de ces éléments permettra de limiter au maximum le stress des animaux et de s'assurer de leur bien-être.

11606 Les arythmies cardiaques sont une cause importante de morbidité et de mortalité dans les pays développés et constituent un problème de santé publique. Certaines arythmies observées peuvent être dues à une mutation génétique rare d'un canal intracellulaire qui joue un rôle essentiel dans la contraction des cellules cardiaques et du cœur dans son ensemble. Les patients ayant ces mutations présentent des troubles du rythme cardiaque, pouvant entraîner une syncope voire une mort subite de ces patients. Or, les anciens médicaments anti-arythmiques se sont montrés inefficaces voire dangereux, et seuls les bêta-bloquants et défibrillateurs implantables semblent capables de prévenir le décès des patients. Dans ce contexte, il est donc nécessaire d'axer la recherche vers le développement de nouveaux agents thérapeutiques contre les arythmies.

De précédentes études ont montré que l'expression d'une protéine régulant le canal essentiel pour la contraction du cœur est diminuée lors d'insuffisance cardiaque, nous laissant supposer que cette dernière joue un rôle essentiel dans le développement des arythmies. De plus, lorsque cette protéine est surexprimée dans les cellules cardiaques, les arythmies cardiaques sont prévenues. Mais à ce jour, les mécanismes contre le développement des troubles du rythme liés à la surexpression de cette protéine restent largement incompris. Afin de progresser dans la compréhension de ces mécanismes préventifs et dans le but de développer de nouvelles thérapies contre certaines formes d'arythmies cardiaques, nous avons créé 2 lignées de souris surexprimant cette protéine d'intérêt, avec des niveaux d'expression différents. Cette surexpression est constitutive et spécifiquement cardiaque, elle améliore la fonction cardiaque mais entraîne une hypertrophie cardiaque. Au bénéfice de l'animal, ceci peut être considéré comme phénotype dommageable.

Cette étude a pour but de caractériser la fonction cardiaque de ces 2 lignées de souris par le biais de techniques d'imagerie *in vivo* non-invasive, l'échocardiographie et l'imagerie par résonance magnétique, dont les sessions seront espacées de 48h minimum pour permettre un temps de récupération. Ce projet de caractérisation par imagerie de 6 mois portera sur 20 animaux. Les sessions d'imagerie seront réalisées quand les animaux auront 3 mois, et ne seront pas répétées, pour caractériser la fonction cardiaque à un temps donné. A la fin de l'imagerie, les animaux seront sacrifiés pour analyse histologique des tissus (notamment cardiaque).

Les modèles animaux ne peuvent être remplacés par un modèle *in vitro* ne présentant pas l'environnement cellulaire complexe et adéquate, ni sur des lignées de cellules cardiaques adultes, ces cellules ne conservant pas un phénotype stable et ne survivant pas au-delà de 48h de mise en culture primaire. Néanmoins, nous réduisons au maximum le nombre d'animaux dans la limite statistique raisonnable d'une étude scientifique. Les procédures utilisées se font dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, avec une grille de score définissant les points-limites à partir desquels l'animal sera euthanasié. De plus, les sessions d'imagerie réalisées sous anesthésie et avec monitoring constant n'occasionnent aucune douleur ou angoisse chez les animaux.

11607 Le cortex cérébral constitue l'enveloppe externe du cerveau et compte six couches de neurones organisées régionalement en aires fonctionnelles qui assurent nos aptitudes motrices et cognitives avancées. La grande majorité des neurones corticaux sont générés au cours de l'embryogenèse par les cellules-souches localisées en bordure des ventricules du cerveau antérieur. Les premiers neurones formés sont les neurones des couches corticales les plus profondes, alors que les derniers neurones générés, sont les neurones des couches corticales superficielles. Ces neurones de couches corticales distinctes présentent des connectivités locales ou plus distantes qui leur sont propres.

La période périnatale correspond à une période de plasticité critique durant laquelle les circuits neuronaux corticaux sont formés, éliminés ou raffinés. Des atteintes du cerveau immature perturbent cette période de plasticité et peuvent entraîner la persistance de circuits neuronaux anormaux où la formation de circuits aberrants. Les conséquences de tels circuits peuvent être délétères pour le bon fonctionnement du cerveau et entraîner des troubles cognitifs ou des pathologies telles que l'épilepsie.

L'atteinte du cerveau immature la plus fréquente est hypoxie périnatale, qui concerne près d'une naissance sur 1000. Elle est fréquemment observée chez des grands prématurés, dont le développement pulmonaire est encore largement incomplet.

Ce projet de recherche fondamentale s'intéresse aux conséquences de l'hypoxie sur les neurones corticaux. Étudier leur réponse à une hypoxie nécessite le marquage de populations précises de neurones corticaux (neurones profonds ou superficiels) afin de comparer leur intégrité immédiatement après une hypoxie, mais aussi leur récupération au cours du temps. Dans ce projet de recherche fondamentale, nous utiliserons une approche innovante permettant le marquage d'un faible nombre de neurones et donc d'explorer en détail leurs morphologies, projections et connectivités au cours du temps. L'espèce animale retenue pour ce projet est la souris, dont le développement et l'organisation des réseaux corticaux sont particulièrement bien étudiés. De plus,

le modèle murin d'hypoxie périnatale et actuellement le mieux caractérise et le plus proche de la pathologie humaine. L'utilisation de cette espèce et de ce modèle nous permettra donc de détecter toute modification de la morphologie et de la connectivité des neurones corticaux, tout en assurant une pertinence à la pathologie humaine. Nous estimons qu'un nombre total de 248 souris (48 femelles et 200 souriceaux) sera nécessaire pour accomplir ce projet de 3 ans. Tous les animaux seront euthanasiés après exposition à la procédure 1 puis aux procédures 2 et/ou 3, afin de récupérer les tissus et effectuer une analyse histologique poussée (marquages immunohistochimiques, reconstruction de l'arborisation dendritique...).

Procédure 1 (Classe modérée) : Nous marquerons des populations précises de neurones par électroporation *in utero*, une procédure utilisée dans de très nombreux laboratoires de recherche, et donc optimisée afin de limiter son impact sur le bien-être animal. Les protéines exprimées par cette approche (protéines fluorescentes ou récepteur pour traçage trans-synaptique) n'entraînent aucun effet néfaste sur les animaux.

Procédure 2 (Classe modérée) : Après leur naissance, nous exposerons la moitié des animaux électroporés à une période d'hypoxie de 8 jours (réduction de la concentration d'oxygène à 10%, correspondant à une altitude d'environ 4500 mètres). Les animaux seront ensuite euthanasiés immédiatement après la période hypoxique ou suite à un délai de plusieurs semaines. Ceci nous permettra d'étudier 1) l'impact immédiat d'une hypoxie sur des populations de neurones corticaux nés à des temps embryonnaires plus ou moins précoces, et donc plus ou moins mature lors de la période hypoxique ; 2) leur récupération (complète ou incomplète) au cours du temps.

Procédure 3 (Classe modérée) : Enfin, un petit nombre d'animaux seront injectés à l'aide d'un traceur trans-synaptique en fin de procédure afin d'étudier la connectivité des neurones corticaux après hypoxie. Cette procédure consiste en une injection stéréotaxique d'un virus non pathogène. Seul les neurones électroporés expriment le récepteur pour ce virus et seront donc marqués par l'expression d'une protéine fluorescente qui sera transmise aux neurones connectés (traçage trans-synaptique), permettant ainsi de révéler les réseaux de neurones corticaux. Hormis la craniotomie nécessaire à l'injection, l'expression des protéines rapportrice n'entraînent aucun effet néfaste sur les animaux.

Application des 3Rs :

Remplacement : L'analyse *in vivo* reste incontournable pour ce projet de recherche. En effet, les séquelles neurologiques post-hypoxiques dépendent de mécanismes complexes impossibles à reproduire *in vitro* d'où la nécessité d'un modèle animal pour étudier la pathologie. De plus, la maturation des neurones et leur connectivité ne peut être étudiée que *in situ*, dans un cerveau entier.

Réduction : Notre approche expérimentale nous permet de visualiser, reconstruire et donc analyser plusieurs dizaines de neurones par animal. De plus, la méthode d'échantillonnage utilisée permet non seulement un échantillonnage homogène de notre région d'intérêt, mais aussi l'utilisation des mêmes cerveaux pour des marquages immunohistochimiques, nous permettant de minimiser le nombre d'animaux nécessaire à ce projet. Enfin, nous avons mis en place dans l'équipe depuis plusieurs années un système de préservation de toutes les séries de coupes non utilisées. Cette banque de tissu permet d'optimiser sur le long terme l'utilisation du tissu tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : De nombreuses actions de raffinement seront mises en place lors des procédures décrites dans ce projet. Toute procédure de chirurgie (Procédures 1 et 3) sera accompagnée d'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques, et d'un suivi journalier des animaux afin de détecter et traiter immédiatement tout signe d'inconfort des animaux. Pour la procédure d'hypoxie (procédure 2), les femelles seront échangées tous les 2 jours entre les cages normoxiques et hypoxiques, afin de préserver la quantité et la qualité du lait qu'elles produisent pour nourrir leurs souriceaux, et de minimiser au maximum le stress consécutif à la procédure sur les animaux.

11608 Projet : Les glucocorticoïdes (GC) sont largement utilisés pour le traitement des maladies inflammatoires. Néanmoins à fortes doses ils induisent des effets secondaires tels la survenue d'un

diabète et des anomalies de la répartition des graisses, et augmentent le risque cardiovasculaire. Limiter ces effets secondaires constitue donc un enjeu thérapeutique majeur. Les GC exercent leurs actions via deux relais moléculaires ou récepteurs, le récepteur des glucocorticoïdes (GR) et le récepteur des minéralocorticoïdes. Cependant les mécanismes par lesquels les GC et leurs récepteurs, notamment le GR, perturbent le développement et le métabolisme du tissu adipeux restent à ce jour peu connus et sont au cœur de ce projet de recherche.

Afin d'étudier ces mécanismes, le laboratoire a généré un modèle de souris génétiquement modifié dont le récepteur des GC, GR, est absent du tissu adipeux. Exposées à un excès de GC, ces souris présentent une augmentation de la masse grasse associée de manière paradoxale à une amélioration de leur santé métabolique. L'absence de récepteur des GC au niveau adipeux permet donc un stockage bénéfique des graisses. Une meilleure vascularisation de ces tissus constitue une piste explicative prometteuse. En effet, il est connu qu'au cours de la prise de poids, l'expansion de la masse adipeuse nécessite un apport constant d'oxygène et de nutriments. Une mauvaise adaptation du réseau vasculaire lors de ce développement peut conduire à un défaut d'oxygénation du tissu contribuant ainsi à limiter le stockage et à stimuler l'apparition de phénomènes pro-inflammatoires néfastes. Des données préliminaires indiquent que ce phénomène de vascularisation semble être particulièrement augmenté chez nos souris, suggérant un lien entre le récepteur GR des GC et le réseau vasculaire du tissu adipeux. La poursuite de ce travail participera à la compréhension de ce lien et à l'identification de voies biologiques à potentiel thérapeutique dans le traitement des effets métaboliques secondaires des GC.

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

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 2832 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

11609 La douleur est un problème de santé publique majeur qui diminue la qualité de vie des patients et son traitement constitue un impact économique considérable. Bien que des progrès importants aient été réalisés dans la compréhension des mécanismes de la douleur, peu d'avancées ont été réalisées dans le développement de nouveaux analgésiques. Les opiacés sont encore aujourd'hui les molécules les plus utilisées en clinique et ce malgré leurs nombreux effets secondaires à court et

à long terme comme notamment la dépression respiratoire, la constipation, la tolérance (diminution de l'effet analgésique au cours du temps) et la dépendance. Nous avons démontré dans des travaux antérieurs que certains de ces effets indésirables sont dus à l'activation endogène des récepteurs du neuropeptide FF suite à une administration prolongée d'opiacés.

Récemment, une collaboration internationale nous a permis d'identifier et de breveter un nouveau composé à dualité d'action. Ce composé est à la fois un analgésique opioïde puissant mais également un bloqueur des récepteurs du neuropeptide FF ce qui atténue fortement les effets secondaires associés à son administration chronique, en particulier la tolérance et la dépendance. Le but de ce projet est double. Il s'agira tout d'abord de comparer l'efficacité thérapeutique de ce nouveau composé avec la morphine, qui est l'analgésique le plus utilisé en clinique, et le TRV130 (olicéridine) qui est actuellement en phase III de développement clinique et qui est décrit comme présentant moins d'effets secondaires que la morphine notamment moins de dépression respiratoire. Le deuxième objectif de ce projet sera de développer des analogues de notre composé présentant une meilleure biodisponibilité. Ces analogues seront initialement caractérisés dans des essais *in vitro* et ceux présentant le profil le plus intéressant seront évalués *in vivo* afin de définir un candidat médicament pour les futurs développements. Les effets analgésiques de ces différents composés ainsi que leurs effets secondaires seront évalués chez la souris en adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer : les molécules testées *in vivo* sont caractérisées au préalable *in vitro* pour leur activité et leurs caractéristiques physicochimiques. Cependant, l'évaluation de leur effet sur la nociception ou le syndrome de sevrage n'est réalisable que sur l'animal entier. Il n'existe pas de modèles *in vitro* permettant de réaliser ce travail.

Réduire : Compte tenu de la variabilité dans les différentes expériences prévues et de nos résultats antérieurs, le nombre d'animaux est limité à 10 par groupe, ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans une animalerie dont le fonctionnement est conçu pour maximiser leur confort et limiter leur souffrance. En particulier, les animaux seront hébergés en cohortes, dans un milieu enrichi, et observés quotidiennement par l'expérimentateur ou une personne compétente. Pour chaque procédure, des points limites adaptés ont été définis selon les directives éthiques indiquées par l'association internationale pour l'étude de la douleur

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet : 352 souris

11610 Un dysfonctionnement du système immunitaire peut provoquer la rupture de la tolérance au soi et être à l'origine du développement de maladies auto-immunes. Ainsi, la connaissance approfondie des mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance représente un enjeu capital pour améliorer à la fois la compréhension et le traitement des maladies auto-immunes.

L'objectif de ce projet est d'étudier la capacité du système immunitaire dans un modèle de psoriasis induit par l'application d'une crème à l'origine d'une hypersensibilité sur les oreilles chez des rats déficients en IL34 vs WT. En effet, il a été montré chez la souris que la cytokine IL34 est impliquée dans cette réponse et que l'absence de cette cytokine induit ainsi une réponse moins forte. Notre modèle de rat a montré des différences phénotypiques plus importantes que la souris montrant que ce modèle est plus robuste que la souris. Ainsi, cette étude permettra de connaître plus en détail l'implication de l'IL34 dans la réponse d'hypersensibilité.

L'utilisation des rats Sprague Dawley déficients en IL34 a déjà été validé par le comité d'éthique et le Ministère.

Utilisation maximale d'animaux : 20 rats

Le bien-être animal étant crucial pour nous, le nombre d'animaux a été réduit au maximum, un tableau complet définissant les points limites a été établi afin qu'aucun animal ne se retrouve dans un état de souffrance important. De plus, afin d'améliorer leurs conditions de vie et d'éviter l'angoisse, des produits d'enrichissement sont placés dans la cage (rouleur de carton et paper wool).

L'utilisation d'animaux dans ce cadre ne peut être remplacé, en effet les modèles *in vitro* ne permettent pas de mimer la complexité du système immunitaire dans ce modèle.

11611 Le traitement hormonal de la femme ménopausée par des œstrogènes a pour but de soulager les symptômes causés par la ménopause (comme l'ostéoporose). L'effet de ces traitements sur les risques de cancers du sein, d'accidents thrombo-emboliques et cardiovasculaires ne sont pas claires, ce qui appuie la nécessité de progresser dans la compréhension des mécanismes des effets de ces hormones sur la physiopathologie vasculaire pas seulement chez la femme mais chez l'homme aussi. On sait maintenant que le récepteur aux œstrogènes (ERalpha) agit de deux façons :

En se fixant à ERalpha, le complexe va dans le noyau et modifie l'expression des gènes

En se fixant à ERalpha, le complexe reste accroché à la membrane de la cellule cible et permet des effets rapides.

Ainsi nous étudierons l'implication du ERalpha dans la coagulation et la mécanique artérielle dans 3 modèles de souris :

L'effet de l'absence des œstrogènes chez la souris femelle ovariectomisée (procédure 1) à 1 mois (juste avant la puberté pour ne pas avoir de synthèse d'œstrogènes), au cours du vieillissement (à 6 mois = souris adulte et à 12 mois = souris en pré-ménopause) par rapport à des souris qui possèdent toujours leurs ovaires (SHAM) et produisent donc normalement les œstrogènes (Lot 1).

L'absence totale du récepteur aux œstrogènes (ERalpha) au cours du vieillissement (souris ERalpha à 6 mois et à 20 mois = âge post-ménopause, souris vieilles) chez les femelles (Lot 2) et mâles (lot 3).

L'impossibilité du récepteur aux œstrogènes à s'accrocher à la membrane de la cellule au cours du vieillissement (souris PALM à 6 mois et à 20 mois = âge post-ménopause, souris vieilles) chez les femelles (Lot 4) et les mâles (Lot 5)

Il est prévu d'utiliser 500 souris au total (100 par lot) sur 5 ans. La pression artérielle consciente, la coagulation du sang, les propriétés mécaniques, et la qualité/composition de la paroi des artères sont altérées dans le développement des pathologies vasculaires et lors du vieillissement. Elles seront donc étudiées ici grâce aux procédures suivantes :

L'ovariectomie (procédure 1, concerne uniquement le lot 1) est effectuée sous anesthésie chez 50 femelles. 50 autres sont endormies, mais les ovaires ne sont pas ôtés (souris contrôles SHAM). En attendant leur réveil, les animaux sont placés dans des cages individuelles et chauffées. Une surveillance quotidienne est réalisée. 50 souris (25 « ovariectomisées » et 25 « SHAM ») subissent la procédure 2 puis 3 et les 50 autres subissent la procédure 2 puis 4 à 6 mois et à 12 mois. Elles sont mises à mort à la fin des procédures 3 et 4.

Mesure de la pression artérielle consciente (procédure 2) est mesurée par sphygmomanométrie (comme chez l'homme avec le brassard), chez les 500 souris. Ceci est non invasif. Les souris sont gardées en vie.

Test de coagulation (thrombinographie) (procédure 3) : Après la procédure 2, un maximum de sang est prélevé chez 40 souris/lot anesthésiées puis mises à mort par surcharge d'anesthésique. L'aorte est récupérée.

Mesure des propriétés mécaniques (procédure 4) : les 60 autres souris/lot issues de la procédure 2 sont anesthésiées. Un cathéter de pression inséré dans l'une des carotides et une sonde échographique placée sur l'autre carotide permettent l'enregistrement simultanément la pression et les déformations de la paroi. Les souris sont mises à mort par surcharge d'anesthésique et l'aorte est prélevée.

Dans le cadre du respect des 3 R :

- Réduction : plusieurs types de mesures seront effectuées sur un même animal (procédure 2 et 3 ou 2 et 4). Les procédures 3 et 4 ne pouvant pas être faites sur le même animal à cause de l'utilisation d'anticoagulant dans l'évaluation des propriétés mécaniques).

Notre expertise nous permet de limiter à 15 animaux par groupes pour les études de paroi artérielle et à 10 par groupes pour les études de coagulation. Des tests statistiques non paramétriques adaptés pour des petits effectifs seront utilisés pour analyser les données.

- Raffinement : Toutes les expériences invasives se feront sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Durant le temps de vie des animaux, si l'un ou plus de ces points limites sont observés, l'animal sera mis à mort : à savoir une perte de poids de 10 à 15% sur 3 jours, un isolement, des yeux fermés, un dos voûté, le poil hérissé, une immobilité, une déshydratation, une température corporelle anormale, des yeux et un abdomen creux. Les animaux ne seront pas manipulés dans la même pièce que celle où ils sont hébergés. Les souris seront hébergées de 1 à 5 par cages individuellement ventilées. L'enrichissement du milieu se fera avec du papier plissé et bâtonnets de bois.

-Remplacement : Les mesures de pression artérielle et de coagulation ne peuvent se faire *in vitro*. Nous ne pouvons donc pas remplacer.

Nombre d'animaux : 500 souris au total sur 5 ans

11612 Les nanotechnologies, définies comme l'ensemble des techniques visant à concevoir, caractériser et produire des matériaux à l'échelle du nanomètre, sont un domaine en pleine expansion. Les applications des nanotechnologies sont multiples et la médecine ainsi que le secteur agro-alimentaire n'échappent pas à cette dynamique. Dans l'agro-alimentaire, plusieurs applications connaissent un formidable essor, allant du produit phytosanitaire à des ingrédients incorporés aux aliments ou dans les emballages alimentaires. Cependant, la perception du bénéfice par le consommateur s'efface au profit du risque potentiel face à son exposition quotidienne à des nanoparticules fréquemment ajoutées aux denrées et boissons comme colorants/opacifiants ou encore agents texturants. La présence d'une fraction nanoparticulaire dans des additifs alimentaires courants, à l'exemple de l'or (Au, additif E175) ou de l'argent (Ag, additif E174) alimentaire, cristallise les craintes dans la population générale, avec des conséquences sur l'évaluation des risques devant s'adapter au cas "nano". Peu de données toxicologiques sont en effet disponibles sur le devenir et les effets par voie orale des nanoparticules (NPs). Le potentiel de nocivité lié à l'exposition orale aux nanoparticules suscite de nombreux débats dans la communauté scientifique (impacts sur le microbiote intestinal, immunotoxicité, génotoxicité cancérologique, distribution et effets systémiques). Face à la dynamique de développement des nanotechnologies dans le secteur agro-alimentaire, l'utilisation de ces nouvelles technologies requiert la mise au point de tests de sécurité spécifiques, et est au coeur d'un débat de société sur les risques potentiels pour la santé. L'objectif de ce projet est de caractériser chez la souris, les effets potentiellement délétères d'une exposition orale chronique à deux additifs alimentaires contenant des fractions nanoparticulaires, le E174 (Ag) et le E175 (Au). Ainsi, le présent projet permettra d'approfondir et de suivre chez la souris le devenir des NPs ingérées avec l'alimentation le long du tube digestif, leur absorption intestinale et systémique jusqu'à leur accumulation dans la rate et le foie ainsi que leur impact sur la barrière intestinale dont le système immunitaire et le microbiote intestinal. L'absorption et la distribution de ces additifs seront explorées post-mortem, en utilisant les propriétés d'autofluorescence des oxydes métalliques pour identifier les voies préférentielles d'absorption. Les conséquences fonctionnelles seront évaluées chez la souris (au total 240 animaux) en 3 ans en termes de perméabilité de l'intestin, d'inflammation, de réponses immunitaires et de génotoxicité. Les additifs alimentaires seront incorporés à l'aliment et avant d'évaluer les effets d'une ingestion chronique de ces additifs sur la souris, un test de palatabilité consistant à déterminer l'acceptabilité de l'aliment par l'animal via la mesure de la prise alimentaire sera effectué sur 10 mâles et 10 femelles pour chaque additif (soit 40 animaux). Si le test de palatabilité est concluant, la toxicité chronique des deux additifs (E174 et E175) sera évaluée à trois doses différentes sur les deux sexes avec dix animaux par groupe (soit 120 animaux). Un groupe non traité (contrôle négatif ; 10 souris/groupe) ainsi qu'un groupe exposé à une dose de NPs de référence (contrôle positif ; 10 souris/groupe) seront aussi utilisés dans l'étude pour chaque sexe et chaque NP (Ag et Au) (soit 80 animaux). Ces observations permettront de produire pour les agences sanitaires une estimation du risque d'exposition orale à ces deux additifs. De plus, la règle des 3R a été prise en compte, en toxicologie les méthodes

alternatives ne permettraient pas de répondre à toutes les questions posées d'où la nécessité de disposer d'un modèle physiologique intégré. Le bien-être animal est pris en compte par la mise en place d'un enrichissement des cages par ajout de matériel de nidification en papier absorbant et petite maisonnette, ainsi qu'un hébergement en groupe des animaux. Etant donné la variabilité observée dans ces expérimentations animales, nous utiliserons des groupes de 10 souris dans l'étude de toxicité pour minimiser le nombre d'animaux tout en obtenant des résultats statistiquement interprétables.

11613 Plusieurs races d'âne françaises sont en voie de disparition du fait d'effectifs limités. Une banque de semence congelée d'âne a été préventivement mise en place pour leur sauvegarde en vue d'une ré-introduction future. Cependant, il est nécessaire d'améliorer la fertilité de cette semence pour que le dispositif soit réellement efficace. En effet si la fertilité de la semence congelée d'étalon après insémination de jument ou d'ânesse est bonne, la fertilité de la semence congelée d'âne est faible. Paradoxalement, la semence congelée d'âne a une fertilité plus élevée chez les juments que chez les ânesses.

La fertilité après insémination étant étroitement liée au bon transit des spermatozoïdes jusqu'au site de fécondation, ce projet a pour but de comprendre le rôle du transit des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle dans l'infertilité chez les ânes par comparaison des espèces cheval et âne. Pour cela, le transit des spermatoïdes d'étalon et d'âne chez la jument et l'ânesse sera quantifié par imagerie *in vivo*. Ceci sera réalisé avec de la semence fraîche et de la semence congelée pour mesurer l'effet de la congélation sur le transit.

La méthodologie consiste à déposer les spermatozoïdes dans l'utérus, et les visualiser à intervalles réguliers après leur dépôt par une méthode d'endomicroscopie. Leur comptage dans les différents compartiments du tractus permettra de déterminer la vitesse du transit tandis que la mesure de leur mobilité permettra de déterminer leur durée de survie.

Ce projet implique 20 animaux : 5 étalons, 5 juments, 5 ânes et 5 ânesses. Tous ces animaux sont des reproducteurs utilisés dans l'élevage pour la reproduction du troupeau et participent ponctuellement à ce protocole. Le nombre d'animaux inclus dans l'étude et les procédures expérimentales ont été choisis afin de respecter au maximum les pratiques des 3R (Réduction, Remplacement, Raffinement). Réduction : Les effectifs des lots d'animaux ont été calculés afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs avec un nombre minimum d'animaux. Remplacement : La complexité du processus de migration des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle ne peut pas être étudiée par des études *in vitro* et nécessite de réaliser des études expérimentales *in vivo*. Raffinement : Les étalons, les ânes, les juments et les ânesses sont logées en bâtiment conventionnel sur aire paillée avec accès au pâturage, en visibilité et contact des congénères.

11614 La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est un problème majeur de santé publique. Les projections de l'Organisation Mondiale de la Santé suggèrent que cette maladie chronique et évolutive deviendra la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde d'ici 2020. Elle est caractérisée par une obstruction et une inflammation chronique des bronches (bronchite chronique) et d'une destruction des alvéoles pulmonaires (emphysème) peu ou pas réversible. Ceci se traduit par une diminution de la fonction respiratoire et impacte sur la qualité de vie et l'autonomie des patients. De plus, l'apparition de périodes d'exacerbation d'origine infectieuse amplifie ces phénomènes et accélèrent le déclin de la fonction respiratoire, précipitant la mort des patients.

La prise en charge de la BPCO est limitée au traitement des symptômes, puisqu'il n'existe aujourd'hui aucun traitement curatif.

Une meilleure compréhension de la physiopathologie de la BPCO et de ses exacerbations est donc nécessaire pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les échantillons humains, notamment ceux des stades précoces de la BPCO qui permettent de comprendre les mécanismes de la physiopathologie et d'identifier des marqueurs prédictifs et progressifs de la maladie, ne sont malheureusement pas/peu disponibles. Des modèles animaux

de BPCO ont été développés uniquement chez la souris et le primate non humain (PNH). Même si le modèle murin a permis de caractériser certains mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la BPCO, notamment de l'emphysème, ce modèle est imparfait puisqu'il ne rend pas compte de la composante de bronchite chronique. De plus, le poumon des souris diffère fortement de celui de l'homme, d'un point de vue anatomique et physiologique.

Récemment une équipe américaine a développé avec succès un modèle de BPCO chez le PNH, qui mime mieux la pathologie humaine et permet 1/ d'envisager une meilleure compréhension de la maladie et 2/ de tester de nouvelles approches thérapeutiques, notamment des biomédicaments. Néanmoins, ce modèle ne prend pas en compte les périodes d'exacerbations infectieuses de la BPCO, évènements critiques dans l'évolution de la maladie

Les primates non humains représentent un bon modèle pour : 1/ mimer la physiopathologie de la BPCO, compte tenu des données de la littérature, 2/ d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et 3/ évaluer des traitements de type biomédicaments administrés par aérosol, car ils sont proches de l'Homme d'un point de vue de la proximité phylogénique, de l'anatomie et la physiologie pulmonaire.

Parmi les PNH, le singe cynomolgus est choisi car : 1/ c'est l'espèce modèle de la littérature, 2/ c'est une espèce de référence pour les études réglementaires des biomédicaments, 3/ en dehors de l'homme, c'est l'espèce de l'ordre des primates la mieux documentée d'un point de vue génomique et immunologique et 4/ c'est une espèce bien maîtrisée et pertinente pour l'administration de thérapies par aérosol. Enfin, d'un point de vue moléculaire, la proximité moléculaire et la distribution d'expression des cibles thérapeutiques similaire à celle de l'homme favorisent la transposition des résultats à l'homme.

Notre projet incluant 2 saisines interconnectées a pour objectifs :

- De reproduire le modèle de BPCO déjà décrit la littérature pour pouvoir étudier la physiopathologie de la maladie
- De définir les doses infectieuses de pneumocoque chez le primate-non-humain.
- De développer un modèle de BCPO exacerbée (pneumocoque) pour étudier la réponse anti-infectieuse de l'animal et l'impact sur la progression de la maladie.
- D'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et tester de nouveaux médicaments les ciblant

Cette saisine impliquera au maximum 41 animaux sur 5 ans. La mise en place des modèles de BPCO exacerbée nécessite 17 animaux ; ceux impliquant des biomédicaments 24 animaux (3 biomédicaments testés). Le plan expérimental a été établi de sorte à répondre à la règle des « 3R » :

- Remplacer : des études *in vitro* seront réalisées en amont pour les biomédicaments afin de déterminer leur efficacité biologique.
- Réduire : 3-4 animaux par groupe est le minimum nécessaire pour prendre en compte la variabilité interindividuelle (paramètres respiratoires, biologiques, ...).
- Raffiner : compte tenu de la durée des expérimentations, les animaux seront entraînés pour les gestes simples (sortie de la cage, prélèvement sanguin, pesée, ...). Certains gestes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale. Durant ces procédures, les animaux seront surveillés par le personnel compétent. Toutes les procédures ont été optimisées de façon à n'induire aucune détresse et douleur ou le cas échéant, de les réduire (prévention des escarres, de l'hypothermie, monitoring cardio-pulmonaires, utilisation de matériel et techniques dédiées à la clinique humaine et pédiatrique, mise sous oxygène, administration d'antalgiques ...). Les animaux seront hébergés ensemble en volière (enrichissement social) avec enrichissement du milieu (recherche et diversité de l'alimentation, manipulation d'objets, échelles, plateformes surélevées.).

11615 De nombreuses bactéries pathogènes pour l'Homme sont désormais résistantes à la plupart des antibiotiques utilisés en clinique. Les problèmes de traitement et de contrôle des maladies infectieuses représentent un danger pour la santé publique à l'échelle mondiale. Par conséquent, il est urgent de développer de nouveaux composés pour contrôler les populations de bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques.

Parmi ces bactéries pathogènes, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella* sont responsables de nombreuses infections. *P. aeruginosa* est l'une des principales bactéries responsables d'infections nosocomiales et colonise 70% des patients atteints de mucoviscidose. Les salmonelles sont l'une des 4 principales causes de maladies diarrhéiques dans le monde. Parmi les salmonelles, *S. enterica* serovar Typhi provoque la fièvre typhoïde, une importante cause de morbidité et de mortalité dans les pays en développement. La résistance aux antibiotiques de ces bactéries est une source d'inquiétude pour la santé publique dans le monde entier.

Nous avons synthétisé une série d'inhibiteurs puissants d'une enzyme originale qui est essentielle à la survie bactérienne. Les meilleurs composés possèdent une activité bactéricide *in vitro* à des concentrations comparables à celles des antibiotiques utilisés actuellement en clinique.

Notre objectif à ce stade est de démontrer l'activité antibactérienne de nos composés *in vivo* dans des modèles murins d'infection à *P. aeruginosa* et *S. enterica* serovar Typhimurium. En effet, les approches cellulaires ne peuvent mimer la complexité des poumons et de l'intestin, sites des interactions tissulaires avec ces pathogènes. La souris peut être colonisée par ces pathogènes. Elle peut également développer des pathologies similaires à celles observées chez l'homme. La souris est donc l'espèce la plus utilisée pour l'étude de l'infection par ces pathogènes. Elle est également très utilisée pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques curatives ou préventives.

Nous utilisons en priorité des méthodes substitutives afin de cribler nos composés et d'étudier leur efficacité et leur toxicité *in vitro*. Cependant, le développement d'une nouvelle molécule thérapeutique nécessite un modèle animal mimant la pathologie humaine. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous limiterons notre étude *in vivo* aux molécules qui auront montré la plus grande activité antibactérienne et la plus petite toxicité cellulaire *in vitro*.

Nous mettrons en place le protocole généralement utilisé dans la littérature pour tester l'efficacité d'une première molécule antibiotique issue de nos travaux préliminaires. Les infections seront réalisées sur des souris BALB/c femelles de 8 semaines et de poids similaires qui auront été acclimatées à leur nouvel environnement pendant une semaine. Le projet utilisera deux souches : *P. aeruginosa* et *S. enterica* serovar Typhimurium. L'établissement de l'inoculum bactérien optimal injecté, la caractérisation de l'effet dose/réponse du composé (procédure 1, sévérité modérée) et le suivi de l'infection par bioluminescence (procédure 2, sévérité modérée) nécessiteront un total de 378 souris. Les dommages attendus sont limités aux souris infectées du groupe contrôle traité avec un placebo qui développeront une inflammation pulmonaire ou une fièvre entérique selon la bactérie utilisée.

Afin de respecter la règle des 3R, des études préliminaires ont été réalisées *in vitro* afin de sélectionner le meilleur composé et *in vivo* pour montrer son absence de toxicité. Le nombre de souris utilisé sera donc réduit au strict minimum et toutes les procédures comporteront des mesures pour limiter la souffrance et l'angoisse des animaux. Le suivi de l'infection par imagerie non invasive permettra également de réduire le nombre de souris nécessaire à l'étude et d'anticiper les points-limites. Cette procédure expérimentale sera réalisée sur des souris anesthésiées placées sur une platine chauffante. Des points-limites adaptés pouvant être facilement surveillés ont été établis afin d'interrompre l'expérimentation en cas de souffrance importante des animaux. Le bien-être des souris sera pris en compte depuis la phase d'acclimatation jusqu'à la phase expérimentale pendant laquelle une visite quotidienne permettra une gestion de la douleur suivant des critères bien définis. L'état de l'animal sera évalué et s'il se détériorait progressivement sans retour à la normale jusqu'à conduire à la prostration, le hérissément des poils, le tremblement et la perte de poids supérieure à 20%, les animaux concernés seraient mis à mort de manière anticipée pour éviter d'atteindre des niveaux significatifs de souffrance et/ou de détresse. Les pesées et les injections seront réalisées par un manipulateur expérimenté pour réduire le stress lié à ces gestes.

La variable primaire sur laquelle sera appliquée l'analyse statistique est l'efficacité du traitement, mesurée par numération bactérienne des unités formant colonie (UFC). 3 groupes de traitement seront considérés, pour lesquels les comparaisons suivantes seront réalisées : placebo vs nouvelle molécule et nouvelle molécule vs lévofloxacine. Ceci indique qu'un test de Student ou un test de Mann Whitney est adapté. La taille d'effet est déterminée à l'aide du logiciel G*Power, pour un

risque de 5%, une puissance 95% et 6 souris par groupe. Ceci correspond à une taille d'effet de 2,31 pour un test de Student et 2,39 pour un test de Mann Whitney Wilcoxon. D'après la littérature ceci correspond à un effet fort. Cette taille d'effet suggère que l'on s'attend à détecter des différences élevées entre les groupes. Enfin, lors de l'analyse statistique, le test de Student sera appliqué sur le log des UFC.

11616 Le but du projet est de déterminer l'impact de la délétion d'un gène sur les mécanismes de régulation des graisses (homéostasie lipidique), dans le cadre d'un régime enrichi.

Ce projet sera réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, afin de mettre en évidence l'impact de la suppression du gène, par comparaison avec des animaux contrôles. Ce projet visant à étudier un mécanisme physiologique complet, l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut actuellement se substituer à l'étude du gène cible dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme.

Ce projet s'appliquera sur 36 souris. Les souris utilisées sont issues de lignée en cours d'élevage et pour lesquelles aucun phénotype létal ou majeur n'a été observé.

Pour procéder à cette étude, des souris mutantes n'exprimant plus le gène d'intérêt sont générées et étudiées en comparaison avec des animaux contrôles. Une cohorte de 36 animaux sera utilisée afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude. Ces animaux seront soumis à un protocole comportant différents tests permettant de caractériser les capacités d'homéostasie lipidique et la composition corporelle, à différents âges.

Tous les tests utilisés font partie des tests de phénotypage classiquement utilisés dans la recherche préclinique et décrits dans la littérature. Cette batterie de tests permet de mettre en place un ensemble de données visant à déterminer l'impact de cette délétion dans le cadre d'un enrichissement du régime en sucres et en graisse.

Ce protocole utilisant plusieurs tests successifs avec un nombre d'animaux optimal permet de réduire le nombre d'animaux utilisés afin de satisfaire les exigences de réduction.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux, ainsi qu'une pesée hebdomadaire. Par ailleurs, nous mettrons en oeuvre tous les moyens d'amélioration de leurs conditions de vie, durant et entre les procédures expérimentales (gestion de la douleur et de l'inconfort à l'aide d'anesthésiques et d'analgésiques, réveil sur tapis chauffant) et nos procédures disposent de points limites adaptés et validés avec notre structure du bien-être animal.

11617 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) permettent d'améliorer l'état de santé des patients. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Dès lors, ils constituent une source potentielle de réactions indésirables. Le risque d'effets graves et irréversibles, tel qu'un effet génotoxique, est une préoccupation importante et il est indispensable que ce risque soit réduit autant que possible.

Il est donc impératif, comme l'exige la réglementation, d'identifier un tel risque pour pouvoir le réduire au minimum avant de mettre un produit sur le marché et l'utilisation d'animaux est à ce jour primordiale pour y parvenir. Si des méthodes alternatives permettent d'identifier certains risques génotoxiques, elles ne permettent pas de couvrir l'ensemble d'entre eux, étant donné la complexité des mécanismes impliqués *in vivo* (par exemple, en raison de la pharmacocinétique du produit, c'est-à-dire son devenir dans l'organisme). Les essais *in vivo* sont donc généralement requis en complément des études *in vitro*.

Des modèles animaux sont donc définis pour chaque type d'essai réglementaire à mener : il s'agit dans ce projet de souris. Le nombre minimum d'animaux est défini dans les textes pris pour référence (lignes directrices de l'OCDE). Par an, jusqu'à 500 souris peuvent être utilisés dans le cadre de ce projet.

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

anesthésie et analgésie des animaux au préalable). Enfin, les souris étant des animaux grégaires, elles sont hébergées en groupes. Un bedding (copeaux) est déposé sur le sol et des enrichissements sont disposés dans la cage (par exemple, produits de nidification ou bâtons à ronger). Enfin, de la musique est diffusée dans les salles d'hébergement.

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

11618 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie rare avec une prévalence de 10 à 20 cas pour 100 000. Elle conduit à une insuffisance respiratoire et au décès avec une médiane de survie de 3 ans après diagnostic. Il n'existe actuellement aucun traitement efficace. La fibrose pulmonaire (FP) est le fait d'une cicatrisation exagérée des tissus pulmonaires avec accumulation de collagène qui envahit l'espace alvéolaire et induit une insuffisance respiratoire qui s'aggrave progressivement. Les mécanismes cellulaires et tissulaires qui en sont responsables sont partiellement connus. On sait qu'il existe une prolifération de cellules fibroblastiques et que d'autres cellules pulmonaires tapissant les alvéoles pulmonaires se transforment en cellules capables de synthétiser du collagène mais aussi de migrer et d'envahir les espaces alvéolaires. Le transforming growth factor (TGF)-b1 est un médiateur intercellulaire, qui est surexprimé en cas de fibrose pulmonaire et régule positivement les mécanismes cellulaires responsables de la fibrose. On sait que dans les cellules pulmonaires il existe d'autres médiateurs qui limitent les effets du TGF-b1. Parmi eux, TIF1g appelé aussi TRIPartite Motif-containing 33 (TRIM33). TIF1g est surexprimé dans les poumons de patients souffrant de fibrose pulmonaire et ceux d'animaux souffrant de fibrose pulmonaire induite expérimentalement par la bléomycine. Mieux connaître son mode de fonctionnement, ses interactions avec le TGF-b1 pourrait constituer une nouvelle option thérapeutique limitant le développement de la fibrose. Nos résultats préliminaires montrent que la régulation des voies pro- et anti-fibrosantes impliquant TGF-b1 et TIF1g est complexe et concerne différentes cellules pulmonaires, mésothéliales, épithéliales et fibroblastiques, interagissant dans un système dynamique. C'est pourquoi il est indispensable de travailler *in vivo* sur l'organe pulmonaire entier pour bien comprendre le rôle de ce médiateur dans la communication intercellulaire impliquée dans le développement de la fibrose. De plus, nous avons la possibilité de travailler sur des souris génétiquement modifiées pour qu'elles n'expriment pas TIF1g sélectivement dans les poumons. Notre hypothèse scientifique est que la fibrose induite expérimentalement sera plus importante chez les souris déficientes pour TIF1g par rapport aux souris non génétiquement modifiées. Ce résultat est pour nous un pré-requis indispensable à l'initiation d'un axe de recherche visant à développer des molécules renforçant l'activité de TIF1g en cas de fibrose pulmonaire. Notre projet nécessite une première série de 20 souris qui nous permettront d'optimiser notre protocole expérimental et une deuxième série de 36 animaux (18 génétiquement modifiées et 18 sauvages), qui nous permettront de tester l'influence de l'absence d'expression de TIF1g sur le développement de la fibrose pulmonaire.

Notre modèle expérimental de fibrose pulmonaire consiste en l'administration chez la souris d'un médicament anticancéreux la bléomycine connu pour ses effets profibrosants au niveau pulmonaire. C'est le modèle expérimental d'induction de la fibrose pulmonaire internationalement validé. Avant l'administration de la bléomycine, les animaux bénéficient pendant une semaine d'une alimentation enrichie, pour limiter la perte de poids induite par la bléomycine, et cette alimentation est maintenue jusqu'à l'euthanasie des animaux. L'administration de la toxine est réalisée sous anesthésie générale des animaux, et dès lors, les animaux sont surveillés au jour le jour par mesure du poids et observation de leur comportement. Une perte de poids supérieure à 20% du poids initial entraînera l'euthanasie de l'animal. D'après notre connaissance du modèle, les animaux seront euthanasiés 21 jours après le début des injections. Ce délai est suffisant pour visualiser l'installation d'une fibrose sans attendre a priori de mortalité à la fin de l'expérimentation. Le nombre d'animaux nécessaire à l'étude correspondra au nombre minimum permettant une étude statistique.

11619 La maladie du greffon-versus-l'hôte (GVHD) est une complication fréquente et grave lors de greffes de moëlle osseuse réalisées dans le cadre du traitement de leucémie ou de lymphomes. La GVHD

est le produit d'une attaque de l'hôte par les cellules T présentes dans la moëlle osseuse et l'élimination de ces lymphocytes T permet de prévenir la GVHD mais cela a comme conséquence la perte de la réaction de la greffe versus-tumeur (GVT) et le pourcentage de rechute de leur leucémie ou lymphôme augmente à un niveau inacceptable. Il faut donc développer de nouveaux traitements permettant d'inhiber la GVHD sans affecter la GVT. L'objet de cette saisine est la mise en place de ce modèle ainsi que son utilisation pour tester de nouveaux traitements via l'utilisation de molécules ou cellules immunomodulatrices. Pour cela, nous injecterons en sous-cutanée des rats RRGs avec 1 lignée tumorale et une fois que les tumeurs seront détectables (quelques jours après implantation) nous injecterons des PBMCs humains de sujets sains qui devraient dans un groupe contrôle (anticorps avec isotype identique à la molécule testée ou cellules sans effet immunomodulateurs) rejeter les tumeurs par GVT avant la survenue de la GVHD (caractérisée par la perte de poids) tandis que les animaux traités avec les molécules ou cellules immunomodulatrices devraient avoir une GVHD retardée et la GVT.

Tous ces paramètres ont été définis mais ils ne peuvent être détaillés car certains sont soumis à publication.

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit :

- Remplacer : Des études fonctionnelles *in vitro* ont été réalisées au préalable sur les différents anticorps ou molécules immunomodulatrices pouvant être utilisées. Mais du fait de l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire, ces études ne peuvent remplacer les études *in vivo*.

Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immunorégulatrice de ces molécules dans des modèles *in vivo* proche de l'homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique pourra être le modèle de rats dits "humanisés".

-Réduire : le nombre d'animaux a été réduit à 720 rats, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Nous utiliserons 6 animaux injectés avec molécules ou cellules immunomodulatrices et 6 animaux contrôles avec des molécules ou cellules de même isotype sans aucune propriétés immunomodulatrices par mois et nous réaliserons ce type d'expérimentations avec 2 donneurs différents soit 24 animaux par type de molécules. Sur une année, cela équivaut à 144 animaux/an. Ce projet ayant une durée minimum de 5 ans, nous utiliserons donc au total un maximum de 720 rats. Ce nombre maximal pourra être diminué en fonction du nombre d'animaux qu'il est possible d'injecter avec le nombre de PBMC recueillis par donneur différents.

Pour éclaircir ce nombre d'animaux, veuillez trouver un chronogramme en pièce jointe

- Raffiner : Un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos voûté, agressivité.) sera réalisé. De plus, les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids le plus élevé, ceux-ci seront euthanasiés ainsi que les animaux montrant des signes caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. Un suivi du développement tumoral sera également effectuée de manière journalière grâce à un caliper. De plus, afin de réduire l'angoisse, un produit d'enrichissement (igloo en PVC) sera utilisé et placé dans des cages en portoirs ventilées. Durant le protocole, une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée pour leur poids, leur comportement et des prélèvements sanguins seront effectués toutes les semaines à compter de la semaine 0 suivant l'injection des PBMCs humains afin de valider la persistance des cellules humaines chez les rats "humanisés". Les animaux contrôles et injectés avec des anticorps ou cellules immunomodulatrices seront analysés afin d'obtenir un maximum d'information post-mortem : par anatomopathologie pour étudier les lésions dans les tumeurs dues à la réaction GVT et par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

La validation de molécules dans ce modèle préclinique de rats humanisés pourra être une étape essentielle avant les tests cliniques.

11620 Chez l'Homme les anévrismes intracrâniens (AIC) sont des malformations vasculaires du cerveau présentes chez 2 à 5% de la population générale. Les anévrismes sont susceptibles de se rompre avec le temps avec un risque annuel cumulatif moyen d'environ 1%. Ce risque varie d'un patient à un autre selon de nombreux critères, mais reste probabiliste pour un anévrisme donné. La rupture d'un AIC provoque un Accident Vasculaire Cérébral (AVC) de type hémorragique pour 10/100 000 habitants par an. Plus précisément, la rupture d'un AIC entraîne une hémorragie sous arachnoïdienne (HSA) dont les conséquences peuvent être dramatiques. Malgré les progrès thérapeutiques récents, un épisode d'HSA reste létal dans 65% des cas et cause des séquelles neurologiques graves chez 50% des survivants. En cas de rupture, des traitements efficaces et durables existent et font appel, dans des centres spécialisés, à des stratégies pluridisciplinaires sujettes à recommandations. Néanmoins, il n'existe pas aujourd'hui de consensus médical pour le traitement préventif des AIC non rompus, découverts fortuitement, alors même que les progrès techniques de l'imagerie médicale permettent de révéler de plus en plus d'anévrismes intracrâniens.

Chez ces patients porteurs d'anévrismes pourtant parfaitement asymptomatiques cette découverte laisse planer une menace. Cette menace réelle et/ou ressentie implique une décision médicale cohérente et adaptée au risque de chaque patient. Il n'existe pas de traitement préventif non invasif dans cette pathologie. Seuls les traitements invasifs ont fait preuve de leur efficacité mais sont associés à une morbi-mortalité incompressible (3 à 15 %) parfois supérieure au risque lié à l'évolution de l'anévrisme. Cette absence d'alternative médicamenteuse est le corollaire direct d'un manque de connaissance des mécanismes de formation, de progression, et de rupture des AIC.

L'objectif de ce projet est donc de tester différentes stratégies thérapeutiques dans un modèle d'AIC chez le rongeur. Ces stratégies thérapeutiques s'axent sur une investigation en parallèle de la physiopathologie de l'anévrisme intracrânien, via une étude morphologique non invasive (IRM) à partir d'un modèle précédemment décrit dans la littérature. La connaissance approfondie de la physiopathologie qui découlera de ces études nous permettra de tester des substances susceptibles d'interférer favorablement avec l'histoire naturelle de la pathologie. Nous réaliserons ainsi des expériences de pharmaco-stabilisation de ces anévrismes toujours sur le même modèle. La réalisation de toutes ces études nécessitera 200 souris réparties de la façon suivante : 20 animaux pour la mise en place du modèle dans le laboratoire ; 140 animaux pour l'étude de la physiopathologie de l'AIC ; 40 animaux pour l'étude de pharmaco-stabilisation.

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

Mots clefs : Accident Vasculaire Cérébral ; Anévrisme Intracrânien ; Hémorragie sous Arachnoïdiennes ; pharmaco-stabilisation.

11621 Le pancréas joue un rôle clef dans l'homéostasie nutritionnelle par la synthèse et la sécrétion d'hormones et d'enzymes digestifs. Cet organe inclut des cellules endocrines et exocrines. Le pancréas exocrine se compose de cellules acinaires et canalaire, alors que les cellules endocrines sont regroupées en des îlots de Langerhans. Ces derniers correspondent à des micro-organes spécialisés composés de quatre différents types de cellules : alpha, bêta, delta, et PP produisant les hormones glucagon, insuline, somatostatine et PP (polypeptide pancréatique), respectivement. L'insuline et le glucagon fonctionnent de façon coordonnée pour contrôler l'homéostasie du glucose

(ou glycémie), alors que la somatostatine et PP régulent la sécrétion d'autres hormones et d'enzymes exocrines.

Comprendre comment les cellules bêta sont générés au cours du développement, mais aussi à l'âge adulte, est une condition préalable à la conception de nouvelles thérapies de régénération cellulaire dans le contexte de la recherche sur les diabètes de type 1 type 2, deux maladies résultantes in fine en la perte ou diminution importante du nombre de cellules bêta. Spécifiquement, notre recherche se concentre sur le diabète de type 1, une maladie auto-immune qui se caractérise par la perte sélective de cellules bêta. Sans traitement, cette condition peut avoir de graves conséquences telles que des dommages vasculaires, des risques de cécité, d'amputation, ou même la mort. Les traitements actuels consistent en l'injection d'insuline exogène pour compenser la déficience en cette hormone. Cependant, les facteurs environnementaux tels que l'exercice, le régime alimentaire, la grossesse, ou l'âge, peuvent provoquer de fortes variations dans les niveaux de glucose sanguin, malgré un traitement à l'insuline, et donc éventuellement conduire aux complications présentées précédemment. La transplantation d'îlots représente un substitut au traitement à l'insuline mais la pénurie de donneurs empêche son utilisation généralisée.

Ainsi, d'autres alternatives doivent être développés afin de traiter efficacement les conséquences du diabète. Dans ce but, nous avons récemment montré que l'expression forcée du gène Pax4 dans les cellules alpha pancréatiques résulte en leur régénération et conversion en cellules « beta-like » fonctionnelles capable de « soigner » *in vivo* un diabète induit de façon chimique. Une caractérisation des mécanismes impliqués démontra l'implication de différentes gènes (Rspo1, Rspo3, Gfi1, Ghrelin Pax4, E2f1, Gephyrin). Afin de mieux caractériser les effets dans le pancréas, nous avons généré des animaux permettant la perte ou l'acquisition de fonction de ces gènes dans le pancréas. De façon surprenante, nos résultats d'expériences pilotes suggèrent que ces souris présentent une augmentation du nombre de cellules produisant l'insuline, une amélioration de la tolérance au glucose ainsi qu'une sensibilité à l'insuline significativement augmentée. Nos résultats préliminaires montrent aussi une "résistance" à un régime riche en graisse. En effet, un tel régime résulte normalement en une obésité et un diabète. De façon intéressante, nous démontrons une obésité mais aucun diabète dans les animaux mutants.

Nous proposons donc de tester les mécanismes impliqués de façon plus systématique afin de déterminer si Rspo1, Rspo3, Gfi1, Ghrelin (Ghr) Pax4, E2f1 et Gephyrin (Gphn) ne pourraient pas représenter des cibles d'intérêt pour le traitement du diabète. Pour cela, nous soumettrons ces animaux à un régime riche en graisse et suivrons le poids, la glycémie et l'évolution de la fonction de leurs cellules beta par des tests de tolérance au glucose ou à l'insuline. Des prises de sang seront aussi nécessaires pour établir le niveau de sécrétion des hormones pancréatique (insuline et glucagon) dans les animaux transgéniques ainsi que dans les contrôles (WT). En fin d'expérience, des analyses immunohistochimiques seront effectuées sur les pancréas de ces animaux.

Nous prévoyons d'utiliser 2928 souris pour l'ensemble de ce projet qui répond aux exigences de la règle des 3 R :

Remplacement : les effets métaboliques analysés sur le long terme requièrent un système biologique intégré tel qu'un organisme vivant. Ceci ne peut malheureusement pas être modélisé *in vitro*.

Réduction : Nous utiliserons un nombre d'animaux aussi faible que possible. L'application de tests statistiques nous permettra de réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire à l'obtention de résultats significatifs et exploitables et sans prévoir répétition des expériences.

Raffinement : Aucun des animaux utilisés dans ce projet ne présente de phénotype dommageable. Durant toute la procédure, les animaux seront suivis en s'appuyant sur une grille de score permettant d'évaluer et d'objectiver les éventuelles souffrances, et de mettre en oeuvre des points limites précoces et adaptés. Les procédures qui impliquent une anesthésie sont mises en oeuvre en utilisant systématiquement des traitements analgésiques et des critères d'arrêt précoce qui minimisent la douleur et la détresse des animaux. La bonne santé ou la souffrance des animaux seront observées selon des grilles d'évaluations indiquées en Annexes. En amont de chaque procédure, des dispositions (habituations) sont prises pour minimiser tout stress aux animaux. Les

animaux seront hébergés dans les conditions habituelles d'animalerie avec un environnement enrichi, sans isolement et en accord avec la réglementation en vigueur.

11622 L'élevage des poules reproductrices nécessite un rationnement sévère de leur alimentation pendant la croissance et la ponte conduisant à des comportements agressifs fortement remis en cause par la commission européenne. Il apparaît donc important de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la prise alimentaire chez cette espèce afin de mieux la contrôler. La chemerine est une protéine produite par le tissu adipeux et le foie. Chez les mammifères, elle diminue la prise alimentaire. Des travaux récents montrent qu'elle est capable aussi de modifier la flore intestinale et par conséquent modifier la digestibilité des aliments. Cependant, aucune donnée n'est disponible chez la volaille. Notre laboratoire dispose de protéine recombinante chemerine de poulet ainsi qu'un anticorps dirigé spécifiquement contre cette protéine. L'objectif de notre étude est de mieux comprendre le rôle de la chemerine dans le contrôle de la consommation et la digestibilité alimentaire chez la poule reproductrice en croissance. Cent poules reproductrices de souche chair seront utilisées dans ce projet.

Le protocole respecte le principe des 3R :

-remplacement : la prise alimentaire et l'utilisation digestive et métabolique font intervenir un ensemble de mécanismes complexes. La construction d'un modèle *in silico* ou *in vitro* pour prédire ces phénomènes n'est pas possible à cause du manque de données. Compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*.

-réduction : le nombre d'animaux a été réduit à son minimum en tenant compte 1. De la distribution et l'homogénéité des poids des animaux attendus au moment de la procédure expérimentale et 2. de la puissance permettant de montrer une différence significative entre traitements et pertinente d'un point de vue biologique sur la consommation alimentaire, la digestibilité et les paramètres sanguins étudiés.

-raffinement : pour limiter au maximum l'angoisse et la souffrance des animaux, plusieurs mesures seront mises en place. Les poussins seront hébergés au sol en groupe pendant une semaine à une densité inférieure au maximum autorisé. Un minimum de 4 poussins par groupe est nécessaire pour créer des interactions sociales entre les poussins et respecter la taille moyenne d'une couvée. La durée de la procédure expérimentale sera limitée à 2 semaines. Des enrichissements appropriés au milieu de vie (au sol et en cage individuelle) seront mis en place. Les animaux seront visités au moins une fois par jour et toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans le point limite engendrera l'euthanasie des animaux par le personnel qualifié.

11623 De nombreux projets de recherche s'intéressent à l'étude du métabolisme et aux pathologies qui y sont associées comme l'obésité et le diabète de type 2, en constante augmentation chez l'Homme. Le but du présent projet est de mettre au point plusieurs procédures de phénotypage métabolique de la souris. Ces procédures comprennent la mesure de la dépense énergétique couplée à la surveillance de la consommation de nourriture et de boisson (calorimétrie indirecte), la mesure de l'activité, l'analyse de la composition corporelle et la mesure des marqueurs métaboliques plasmatiques. Les procédures seront réalisées sur deux souches de souris qui présentent des résultats différents dans ces procédures.

Ce projet nous permettra de valider nos techniques sur le métabolisme et d'évaluer la robustesse de nos résultats et de nos analyses pour le phénotypage des souris ce qui est un pré-requis pour proposer ces procédures aux utilisateurs.

Pour les conditions de base, les animaux auront le régime alimentaire standard. La moitié de la cohorte des souris sera ensuite nourrie avec un régime riche en graisses pendant 12 semaines qui induira des variations de métabolisme différentes selon les souches de souris. Cette durée est une durée standard permettant d'obtenir des modifications phénotypiques nettes sans atteinte fonctionnelle majeure au niveau des organes. Les différentes procédures seront effectuées avant et après le régime. La calorimétrie indirecte implique d'isoler les souris 4 jours pour les mesures, ce qui peut générer un stress pour ces animaux habitués à vivre en groupe. Aussi, nous évaluerons la

possibilité d'ajouter un enrichissement adapté (carré de ouate, briquette...) dans la cage de mesure sans compromettre la fiabilité des résultats, ce qui permettra d'améliorer le bien-être de l'animal dans cette période d'isolement. Ce projet nous permettra d'acquérir une compétence que la plateforme proposera ultérieurement. Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation d'animaux pour ce projet car l'étude des fonctions métaboliques nécessite de prendre en compte le caractère systémique et la contribution relative des différents organes métaboliques, ce qui ne peut être réalisé que par une approche intégrée *in vivo*.

Nous utiliserons au total 80 souris pour ce projet. Ce nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les protocoles envisagés ne devraient pas engendrer de souffrance particulière néanmoins un suivi individuel des animaux sera réalisé régulièrement en étudiant leur poids, leur prise alimentaire et leur comportement afin d'identifier tout mal-être des souris. Si besoin, des croquettes seront mises directement dans la cage et la fréquence des pesées et des observations sera augmentée. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettront de limiter la souffrance, la douleur ou l'angoisse des animaux et le protocole sera interrompu dès l'atteinte d'un de ces points limites. Les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles seront privilégiés (pesées, mesures de la dépense énergétique, de l'activité et de la composition corporelle). Les prélèvements sanguins seront réalisés sous analgésie et anesthésie gazeuse. Des mesures seront prises pour améliorer le bien-être de l'animal (les souris seront hébergées par cages de 4, des carrés de ouate et des fibres de peuplier seront placés dans les cages pour leur permettre de faire un nid). Toutes les souris seront remises dans leur cage d'origine après chaque série de mesures et en cas d'agressivité, des igloos seront ajoutés dans les cages. Pour améliorer le raffinement lors de la mesure de dépense énergétique (isolement des souris en cage de mesure) nous allons tester la possibilité de rajouter un enrichissement adapté (coton, briquette...) pendant cette période de 4 jours. Les protocoles se feront de façon séquentielle selon les résultats obtenus pour minimiser au maximum le nombre d'animaux.

11624 Les troubles neuropsychiatriques sont aujourd'hui les premières causes de souffrance et d'handicap à l'échelle mondiale, avec les pathologies cardiovasculaires et les tumeurs cancéreuses. La résistance aux traitements pharmacologiques classiques a mené au développement d'alternatives thérapeutiques, les plus prometteuses étant les méthodes de neurostimulation. Le progrès considérable réalisé dans les domaines de la stimulation magnétique et électrique profonde souffre cependant de limitations techniques (précision ou chirurgie invasive).

Il a été démontré récemment que la stimulation transcrânienne par ultrasons, c'est à dire des ondes mécaniques, permettait de moduler l'activité électrique cérébrale de façon non-invasive et géométriquement précise, outrepassant les limites des méthodes actuelles. L'altération de l'activité de certaines zones cérébrales étant caractéristique des troubles neuropsychiatriques, la stimulation ultrasonore pourrait prendre place dans l'arsenal thérapeutique.

Malgré cet intérêt théorique et certaines études exploratoires, la stimulation ultrasonore n'a encore jamais été utilisée dans des thématiques cliniques. En effet, les différents paramètres requis pour provoquer une telle stimulation cérébrale sont encore peu étudiés.

Dans un projet précédent qui permit d'évaluer la faisabilité de cette technique chez la souris mâle, nous avons déterminé les paramètres optimaux requis pour réaliser une stimulation magnétique précise et efficace. Dans la poursuite de ce projet, l'objectif de la présente étude est de mettre en œuvre un protocole thérapeutique basé sur la stimulation magnétique dans un modèle murin mâle de dépression. Les effets de ce nouveau protocole sur l'activité cérébrale seront évalués *in vivo* par imagerie scintigraphique avec un marquage au glucose radioactif, une technique qui permet d'observer distinctement le métabolisme cérébral.

Cette demande d'autorisation de projet correspond donc à la partie imagerie du projet déposé initialement dans un établissement utilisateur (EU) voisin. Elle est soumise ici dans cet autre EU car la procédure décrite dans le présent document nécessite l'utilisation d'un imageur scintigraphique, uniquement présent dans l'EU.

Pour cette expérience, 72 souris réparties en 6 lots sont requises.

Les règles de raffinement, remplacement et réduction (3R) sont appliquées à ce projet :

- Raffinement : les différentes procédures seront réalisées sous anesthésie. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu et hébergement en groupe.
- Remplacement : aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée, les procédures doivent être réalisées sur l'animal vivant afin d'engager des études approfondies par la suite.
- Réduction : les effectifs sont optimisés, l'évaluation de plusieurs variables méthodologiques nécessite une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle. De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

11625 La maladie du greffon-versus-l'hôte (GVHD) est une complication fréquente et grave lors de greffes de moëlle osseuse réalisées dans le cadre du traitement de leucémie ou de lymphomes. La GVHD est le produit d'une attaque de l'hôte par les cellules T présentes dans la moëlle osseuse et l'élimination de ces lymphocytes T permet de prévenir la GVHD. Il faut donc développer de nouveaux traitements permettant d'inhiber la GVHD. L'objet de cette saisine est la mise en place de ce modèle ainsi que son utilisation pour tester de nouveaux traitements via l'utilisation de molécules ou cellules immunomodulatrices. Pour cela, nous injecterons des PBMCs humains de sujets sains qui devraient dans un groupe contrôle (anticorps avec isotype identique à la molécule testée ou cellules sans effet immunomodulateurs) avoir une survenue de la GVHD (caractérisée par la perte de poids) tandis que les animaux traités avec les molécules ou cellules immunomodulatrices devraient avoir une GVHD retardée voir supprimée.

Tous ces paramètres ont été définis mais ils ne peuvent être détaillés car certains sont soumis à publication.

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit :

- Remplacer : Des études fonctionnelles *in vitro* ont été réalisés au préalable sur les différents anticorps ou molécules immunomodulatrices pouvant être utilisées. Mais du fait de l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire, ces études ne peuvent remplacer les études *in vivo*.

Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immunorégulatrice de ces molécules dans des modèles *in vivo* proche de l'homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique pourra être le modèle de rats dits "humanisés".

-Réduire : le nombre d'animaux a été réduit à 720 rats, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

- Raffiner : Un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos voûté, agressivité.) sera réalisé. De plus, les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids le plus élevé, ceux-ci seront euthanasiés ainsi que les animaux montrant des signes caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. De plus, afin de réduire l'angoisse, un produit d'enrichissement (igloo en PVC) sera utilisé et placé dans des cages en portoirs ventilées. Durant le protocole, une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée pour leur poids, leur comportement et des prélèvements sanguins seront effectués toute les semaines à compter de la semaine 0 suivant l'injection des PBMCs humains afin de valider la persistance des cellules humaines chez les rats "humanisés". Les animaux contrôles et injectés avec des anticorps ou cellules immunomodulatrices seront analysés afin d'obtenir un maximum d'information post-mortem : par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

La perte de poids des animaux entre les animaux des groupes contrôles et traités sera également comparé par le test statistique de Two Way RM ANOVA et leur survie par Log Rank.

La validation de molécules dans ce modèle préclinique de rats humanisés pourra être une étape essentielle avant les tests cliniques.

11626 La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires (environ 1/5000 naissances mâles). Elle est causée par un défaut dans le gène de la dystrophine (chromosome X) et se traduit par une dégénérescence du tissu musculaire. La maladie touche tous les muscles de l'organisme, y compris le muscle cardiaque et le diaphragme. Chez les patients DMD, la marche est définitivement perdue avant 15 ans et le décès survient généralement avant 30 ans. A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif sur le marché, et la thérapie génique est une des approches envisageables pour le traitement de cette pathologie. La thérapie génique envisagée ici passe par le transfert dans les muscles, à l'aide d'un vecteur viral recombinant dérivé du virus adéno-associé (AAVr), d'un gène thérapeutique qui est une copie miniaturisée du gène de la dystrophine humaine, capable de remplacer le gène déficient et de produire une protéine « micro-dystrophine » (MD) fonctionnelle. En effet, les vecteurs AAVr sont trop petits pour permettre le transfert du gène de la Dystrophine dans son entier. Différentes copies miniaturisées (MD) ont été conçues pour contenir des domaines importants de la protéine Dystrophine, qui vont leur permettre d'interagir avec des partenaires essentiels à son fonction dans la cellule musculaire. Parmi ces copies, on trouve la micro-dystrophine MD1 qui a récemment permis d'obtenir des résultats prometteurs dans différents modèles animaux de la DMD. Mais la MD1 ne contenant qu'une partie des domaines considérés comme essentiels dans la Dystrophine native, nous souhaitons désormais comparer son efficacité avec d'autres versions de micro-Dystrophine (MD2, MD3, MD4...) qui comportent des domaines supplémentaires qui pourraient se révéler importants pour l'interaction de la micro-Dystrophine avec ses partenaires protéiques, et donc l'optimisation de cette approche thérapeutique.

Avec MD1 comme micro-Dystrophine de référence, nous souhaitons comparer, par une analyse en spectrométrie de masse (analyse fine de protéomique), les interactions de différentes versions de micro-Dystrophines avec les partenaires protéiques connus de la Dystrophine. Ces analyses nous permettront de comparer un large panel de candidats de micro-Dystrophines afin de valider leur fonctionnalité « structurale » (définition de la meilleure version pour l'interaction avec les partenaires protéiques de la Dystrophine), sans passer par une étude lourde *in vivo*, qui nécessiterait un très grand nombre d'animaux pour pouvoir comparer toutes les micro-Dystrophines tout en ayant un nombre suffisant d'animaux pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. En effet, suite à cette étude, le potentiel thérapeutique de seulement les meilleurs candidats pourra être évalué dans une future étude pré-clinique *in vivo*.

Les analyses par spectrométrie de masse seront réalisées sur des tissus musculaires et cardiaques provenant de rats DMDmdx (modèle animal de la DMD) injectés avec des vecteurs rAAV portant différentes versions de micro-Dystrophines. Les vecteurs seront injectés par voie intra-péritonéale chez des rats seulement âgés de quelques jours, ce qui permettra un transfert de gène efficace dans les muscles squelettiques et le cœur tout en utilisant une faible quantité de vecteur dont les stocks sont limités. Ainsi, cela nous permettra d'injecter d'un nombre suffisant d'animaux afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Dans ce projet s'étalant sur 5 ans, nous inclurons un maximum de 100 rats DMDmdx avec un nombre de 5 animaux par groupe expérimental.

Dans le respect de la règle des 3R, nous REDUIRONS le nombre d'animaux à 5 rats par groupe. Ce nombre est basé sur notre expérience d'analyse en spectrométrie de masse, pour lesquels l'obtention de tissus à partir de ces effectifs est suffisante pour obtenir des résultats exploitables.

Nous REMPLACERONS l'utilisation d'animaux par des tests *in vitro* dès que cela sera possible comme par exemple pour valider la fonctionnalité structurale de nos vecteurs thérapeutiques avant de les injecter chez l'animal pour évaluer leur fonctionnalité thérapeutique.

Nous RAFFINERONS cette étude par un hébergement des animaux selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu. L'état général de chaque animal sera surveillé de façon

hebdomadaire pour estimer une éventuelle gêne ou douleur liées à l'expression clinique de la maladie. Si nécessaire, le sacrifice de l'animal sera anticipé.

11627 Les conséquences pathologiques à long terme – se révélant à l'âge adulte – d'évènements survenant durant la vie fœtale et la période périnatale définissent le concept de programmation périnatale.

Cette programmation, d'abord fœtale, induit une adaptation du fœtus au milieu intra-utérin et se traduit par des changements permanents au niveau de certains de ses organes. Ces changements peuvent se poursuivre au niveau périnatal selon l'environnement dans lequel va grandir le nouveau-né. Aujourd'hui, il est bien connu que l'obésité maternelle avant et pendant la grossesse provoque un stress nutritionnel et perturbe l'homéostasie du glucose, la sensibilité à l'insuline, la synthèse des acides aminés et le métabolisme des graisses, augmentant ainsi le risque d'obésité et de comorbidité pour le nouveau-né et, à plus long terme, prédispose ces enfants à l'hypertension artérielle. Chez la mère, l'obésité entraîne de graves conséquences sur la fonction vasculaire comme une dysfonction endothéliale et un accroissement du stress oxydant aussi bien dans la pathologie humaine que dans de nombreux modèles expérimentaux. Une transmission directe de ces anomalies vasculaires par des mécanismes d'épigénétique, indépendamment des anomalies métaboliques, pourrait expliquer en partie le développement à l'âge adulte de l'hypertension artérielle chez les enfants nés de mères obèses. Le but de ce travail sera 1) d'évaluer les risques de naître d'une mère obèse, 2) de déterminer si l'alimentation post-natale au cours de la petite enfance peut impacter ces anomalies et enfin 3) d'étudier leur transmission de génération en génération.

Le modèle utilisé est un modèle de rat Sprague Dawley dont les femelles seront rendues obèses par un régime riche en graisse 8 semaines minimum avant les accouplements. Ce modèle d'obésité est le plus proche de la réalité nutritionnelle chez l'homme.

Pour l'ensemble du projet nous utiliserons 888 animaux au total qui seront repartis en expérimentation et en accouplement. Pour l'expérimentation, nous utiliserons 768 animaux répartis en 16 groupes expérimentaux : rats mâles et femelles issus de mères contrôles et de mères obèses, chacun divisé en 2 sous-groupes suivant le régime post-sevrage (régime standard : CMO(S) et OMO(S) ou régime gras : CMO(HF) et OMO(HF), rats mâles et femelles issus de mères contrôles adoptés par des mères obèses et issus de mères obèses adoptés par des mères contrôles, chacun divisé en 2 sous-groupes suivant le régime post-sevrage (régime standard : CAO(S) et OAC(S) ou régime gras : CAO(HF) et OAC(HF). Pour chaque âge d'étude (3, 6, 12 et 18 mois), les groupes seront composés chacun de 12 animaux provenant d'au moins 4 mères différentes et 3 pères différents. Pour l'accouplement, nous utiliseront 120 animaux au total avec 40 mâles non obèses (mâles servant en premier pour reproducteurs des femelles non obèses puis de reproducteurs aux femelles sous régime high fat) et 80 femelles (40 femelles rendues obèses et 40 femelles contrôles, servant également pour les adoptions). Dès que le nombre de 10 petits par groupe est atteint, les accouplements seront arrêtés. Au cours de toutes les procédures expérimentales enregistrées, les animaux sont manipulés par du personnel qualifié utilisant le suivi des points limites via des fiches (indexées en annexe) ; pour la procédure de prélèvement du lait maternel, les rates sont placées sous anesthésie légère, avec un contrôle de la température (tapis chauffant) et de l'état d'endormissement. Lors des adoptions, afin d'éviter le rejet par la nouvelle mère, les petits sont imprégnés de l'odeur de la sciure de la nouvelle mère et sont déplacés de leur nid initial à un autre avec une surveillance quotidienne. Tous les animaux seront placés par groupe afin d'éviter l'isolement, dans des cages avec enrichissement. Les tests statistiques utilisés seront des ANOVA 1 ou 2 facteurs suivants les paramètres mesurés.

11628 La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est un problème majeur de santé publique. Les projections de l'Organisation Mondiale de la Santé suggèrent que cette pathologie chronique et évolutive deviendra la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde d'ici 2020. Elle est caractérisée par une obstruction et une inflammation chronique des bronches (bronchite chronique) et d'une destruction des alvéoles pulmonaires (emphysème) peu ou pas réversible. Ceci se traduit

par une diminution de la fonction respiratoire et impacte sur la qualité de vie et l'autonomie des patients. De plus, l'apparition de périodes d'exacerbation d'origine infectieuse amplifie ces phénomènes et accélèrent le déclin de la fonction respiratoire, précipitant la mort des patients.

La prise en charge de la BPCO est limitée au traitement des symptômes, puisqu'il n'existe aujourd'hui aucun traitement curatif.

Une meilleure compréhension de la physiopathologie de la BPCO et de ses exacerbations est donc nécessaire pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les échantillons humains, notamment ceux des stades précoces de la BPCO qui permettent de comprendre les mécanismes de la physiopathologie et d'identifier des marqueurs prédictifs et progressifs de la maladie, ne sont malheureusement pas/peu disponibles. Des modèles animaux de BPCO ont été développés uniquement chez la souris et le primate non humain (PNH). Même si le modèle murin a permis de caractériser certains mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la BPCO, notamment de l'emphysème, ce modèle est imparfait puisqu'il ne rend pas compte de la composante de bronchite chronique. De plus, le poumon des souris diffère fortement de celui de l'homme, d'un point de vue anatomique et physiologique.

Récemment une équipe américaine a développé avec succès un modèle de BPCO chez le PNH, qui mime mieux la pathologie humaine et permet 1/ d'envisager une meilleure compréhension de la maladie et 2/ de tester de nouvelles approches thérapeutiques, notamment des biomédicaments. Néanmoins, ce modèle ne prend pas en compte les périodes d'exacerbations infectieuses de la BPCO, événements critiques dans l'évolution de la pathologie

Les primates non humains représentent un bon modèle pour : 1/ mimer la physiopathologie de la BPCO, compte tenu des données de la littérature, 2/ d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et 3/ évaluer des traitements de type biomédicaments administrés par aérosol, car ils sont proches de l'Homme d'un point de vue de la proximité phylogénique, de l'anatomie et la physiologie pulmonaire.

Parmi les PNH, le singe cynomolgus est choisi car : 1/ c'est l'espèce modèle de la littérature, 2/ c'est une espèce de référence pour les études réglementaires des biomédicaments, 3/ en dehors de l'homme, c'est l'espèce de l'ordre des primates la mieux documentée d'un point de vue génomique et immunologique et 4/ c'est une espèce bien maîtrisée et pertinente pour l'administration de thérapies par aérosol. Enfin, d'un point de vue moléculaire, la proximité moléculaire et la distribution d'expression des cibles thérapeutiques similaire à celle de l'homme favorisent la transposition des résultats à l'homme.

La saisine comprend 10 procédures expérimentales qui ont pour objectifs :

- De reproduire le modèle de BPCO déjà décrit la littérature pour pouvoir étudier la physiopathologie de la maladie
- De définir les doses infectieuses de pneumocoque chez le primate-non-humain.
- De développer un modèle de BCPO exacerbée (pneumocoque) pour étudier la réponse anti-infectieuse de l'animal et l'impact sur la progression de la maladie.
- D'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et tester de nouveaux médicaments les ciblant

Cette saisine impliquera au maximum 41 animaux sur 5 ans. La mise en place des modèles de BPCO exacerbée nécessite 17 animaux ; ceux impliquant des biomédicaments 24 animaux (3 biomédicaments testés). Le plan expérimental a été établi de sorte à répondre à la règle des « 3R » :

- Remplacer : des études *in vitro* seront réalisées en amont pour les biomédicaments afin de déterminer leur efficacité biologique.
- Réduire : 3-4 animaux par groupe est le minimum nécessaire pour prendre en compte la variabilité interindividuelle (paramètres respiratoires, biologiques, ...).
- Raffiner : compte tenu de la durée des expérimentations, les animaux seront entraînés pour les gestes simples (sortie de la cage, prélèvement sanguin, prise de poids, ...). Les administrations (intraveineuse et aérosolisation) ainsi que certains prélèvements seront réalisées sous anesthésie générale. Durant ces procédures les animaux seront surveillés par le personnel compétent. Toutes

les procédures ont été optimisées de façon à n'induire aucune détresse et douleur ou le cas échéant, de les supprimer (prévention des appuis, de l'hypothermie, monitoring cardio-pulmonaires, utilisation de matériel et techniques dédiées à la clinique humaine et pédiatrique, mise sous oxygène, administration d'antalgiques ...). Les animaux seront hébergés ensemble en volière (enrichissement social) avec enrichissement du milieu (recherche et diversité de l'alimentation, manipulation d'objets, échelles, plateformes surélevées.).

11629 Le rachitisme vitamine D-dépendant est un trouble héréditaire du métabolisme de la vitamine D, d'apparition précoce, caractérisé par de faibles niveaux circulants de calcium, ainsi que des déformations rachitiques du squelette. C'est une maladie rare, dont les traitements sont handicapants et peu efficaces.

Nous avons montré qu'un composé ayant une structure chimique proche de celle de la vitamine D bioactive réduit la sévérité des symptômes chez des souris rachitiques. Dans des systèmes cellulaires, nous avons identifié 10 molécules présentant des activités thérapeutiques pour le rachitisme. Ce projet à l'interface entre la recherche fondamentale et appliquée vise à déterminer le potentiel thérapeutique de ces 10 molécules candidates pour cette maladie réfractaire ainsi que leur mécanisme d'action.

Le rachitisme étant une maladie sévère affectant de nombreux organes, des systèmes in-vitro ne sont pas appropriés. Ces expériences seront donc réalisées sur des souris mâles et femelles ayant un phénotype dommageable.

Une partie des souris utilisées dans cette étude étant rachitiques, des modalités de suivi de l'état de santé, des critères d'arrêts ainsi que des points limites seront mis en place (i.e. absence de gain de poids à la puberté, incapacité à s'alimenter, perte de poids de plus de 15 %). L'expertise du laboratoire sur l'étude des voies de signalisation de la vitamine D chez la souris permettra la mise en place d'expérimentations de qualité et raffinées (i.e. points critiques étroitement surveillés, anesthésie appropriée). A noter que le traitement devrait améliorer les conditions des souris.

Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au strict minimum, tout en s'assurant que les cohortes utilisées permettront de conclure de manière statistiquement significative.

Pour ce projet sur cinq ans, 648 souris seront nécessaires.

11630 De nombreuses maladies neurologiques ainsi que certains médicaments pris de façon chronique peuvent entraîner des troubles moteurs, tels que la catalepsie (difficulté à faire des mouvements volontaires), l'akinésie (impossibilité de réaliser certains mouvements) ou la dyskinésie (mouvements désordonnés).

Quand ils résultent d'une pathologie comme la maladie de Parkinson dont on n'a pas de traitement curatif, le traitement symptomatique de ses troubles soulagerait les patients au quotidien.

Quand ces troubles moteurs sont les effets secondaires du traitement d'une pathologie, il en résulte l'arrêt du traitement ou la diminution de sa dose donc de son efficacité. Dans ce cas, les patients et leurs médecins sont à la recherche soit de nouveau traitement n'ayant pas ces effets secondaires soit d'un second médicament pouvant empêcher ces troubles.

Ainsi pour ces diverses raisons, la recherche actuelle a besoin de développer des nouveaux médicaments empêchant la survenue de ces troubles moteurs mais aussi afin de vérifier que les nouveaux neuroleptiques ne présentent pas comme effets secondaires la catalepsie, l'akinésie ou les dyskinésies.

Dans ce projet, nous nous proposons de tester, des nouveaux composés dans différents modèles de symptômes moteurs afin de participer à l'amélioration du quotidien des patients présentant ces troubles. Pour cela nous disposons de plusieurs modèles animaux de troubles moteurs et nous observons l'évolution du comportement de ces animaux après le traitement par des molécules en développement.

Respect de la règle des 3R :

Remplacement : aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. En effet, les processus moteurs impliquent des interactions multiples et complexes. Bien qu'il soit possible de disséquer les événements individuels en détail avec des études *in vitro*, toutes les interactions impliquées dans la réponse comportementale *in vivo* ne sont pas possibles à simuler *in vitro*.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesures sont mise en œuvre notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement adaptées (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté, enrichissement du milieu : maisonnette pour les souris ; bâtons de bois et/ou tunnel pour les rats), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

Réduire : nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisé. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 10 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 7200 rongeurs (6000 souris et 1200 rats) est envisagée.

11631 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie dans laquelle la réponse immunitaire est altérée. Ceci engendre une atteinte de la gaine de myéline (démýélinisation) du système nerveux central, qui à terme conduit à une perte des fibres nerveuses et à un handicap irréversible chez les patients. Un des défis majeurs dans la SEP est de mieux comprendre les mécanismes de démýélinisation/remýélinisation, afin de développer des stratégies thérapeutiques visant à stimuler la régénération de la myéline. Pour atteindre ces objectifs, il est important de mettre au point des tests fonctionnels permettant d'évaluer de manière non invasive les effets de la démýélinisation et de la remýélinisation sur les capacités locomotrices chez la souris. La mise au point de ces tests locomoteurs permettra de tester et de valider les effets thérapeutiques de molécules pharmacologiques sur la remýélinisation. Ces approches innovantes pourront ainsi permettre le développement de nouvelles thérapies régénératives pour la SEP.

Pour ce projet, nous utiliserons, sur 5 ans, un total de 78 souris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction : le nombre d'animaux utilisés est réduit au strict minimum nécessaire afin de générer des données statistiques significatives ; 2) raffinement : les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement : les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de processus biologiques complexes comme la réparation des lésions de la myéline. Le rongeur est donc l'une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.

11632 Les pathologies impliquant les mitochondries (fournisseurs de l'énergie cellulaire à travers la chaîne respiratoire) sont fréquentes et sévères ; elles possèdent une prévalence de 1 personne sur 4300. La dysfonction de l'organite affecte le système nerveux central, le muscle, le cœur, le pancréas, le foie, le rein et les organes sensoriels. Les interventions thérapeutiques sont peu nombreuses et inefficaces entraînant l'évolution inexorable des symptômes et une morbidité élevée. Depuis une dizaine d'années l'implication de la mitochondrie dans de pathologies neurodéveloppementales est étudiée en particulier pour les troubles du spectre autistique (TSA), la schizophrénie et les troubles bipolaires. À ce jour, malgré les progrès génétiques aucun traitement préventif ou curatif n'a été décrit comme efficace pour enrayer pathologies neurologiques causées par des modifications des mitochondries. La recherche préclinique dans des modèles animaux appropriés devient, ainsi, un enjeu majeur pour développer des thérapies innovantes pouvant ensuite être transférées chez l'Homme.

Le projet de recherche que nous développerons consiste à utiliser les souris Harlequin, comme modèle génétique d'une pathologie mitochondriale (déplétion de la protéine Apoptosis Inducing Factor, AIF) afin de comparer les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de leurs cervelets avec celles des souris knock-out (KO) Fmr1, modèle du syndrome de l'X fragile. Ce syndrome est la cause la plus fréquente de déficience intellectuelle héréditaire. Il est aussi inclus dans les TSA due à la cooccurrence des symptômes de l'autisme chez des patients atteints de l'X fragile.

Notre objectif est double : (1) déterminer si l'atrophie cérébelleuse, due à l'absence de l'AIF et à la dysfonction mitochondriale qui en résulte, chez la souris Harlequin entraîne des troubles cognitifs ; (2) rechercher une corrélation entre les troubles cognitifs de la souris Fmr1 et des perturbations dans le fonctionnement des neurones du cervelet. Ainsi, nous mettrons en place une thérapie génique pour permettre l'expression du gène codant la protéine mitochondriale Neuroglobine (NGB) via l'administration des vecteurs AAV2/2 car nous avons précédemment montré que cette protéine est capable de protéger de façon pérenne la fonction mitochondriale empêchant la mort neuronale dans la rétine et l'atrophie du nerf optique à la fois chez la souris Harlequin et chez la souris DBA/2J, un modèle reconnu du glaucome.

Les troubles cognitifs et moteurs seront évalués par une batterie des tests de manière longitudinale chez des animaux dès l'âge de 2 mois et jusqu'à l'âge de 8-9 mois. Ils seront sélectionnés sur la liste suivante : cylindre rotatif, agrippement, poutre horizontale, locotronic (motricité, équilibre et coordination) champ ouvert, reconnaissance de nouvel objet, sociabilité, labyrinthe en Y, labyrinthe en croix surélevé (apprentissage, mémorisation, sociabilité et réactivité aux situations anxiogènes) et suspension caudale (réponse à un stress aigu).

Par ailleurs, les souris Harlequin présentent une neuropathie optique et une dégénérescence des photorécepteurs dès l'âge de 6 mois. Ainsi, nous souhaitons évaluer la fonction visuelle des souris traitées par thérapie génique avant leur euthanasie pour éviter des interprétations erronées de certains tests comportementaux (champs ouvert, reconnaissance de nouvel objet, labyrinthe en Y, labyrinthe en croix surélevé et Locotronic) pour lesquels une bonne acuité visuelle est nécessaire à leur exécution.

La prévention de l'ataxie cérébelleuse ou la diminution de ses conséquences délétères sera recherchée par une neurochirurgie stéréotaxique qui permettra d'administrer directement à chaque hémisphère cérébelleux un vecteur de thérapie génique (AAV2/9) permettant la production de la protéine AIF ou de la Neuroglobine dans les cellules de Purkinje ; cellules qui disparaissent chez les souris Harlequin à partir de l'âge de 4-6 mois entraînant les troubles moteurs. Des études comportementales seront effectuées chez ces souris avant l'administration du vecteur puis 3 et 6 mois après celle-ci. Suite à l'euthanasie, les cervelets seront évalués sur le plan histochimique, moléculaire et biochimique pour établir l'impact de la thérapie génique sur la fonction mitochondriale et la morphologie du cervelet.

Nous utiliserons au total 440 souris soit 220 par lignée ; la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement) a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée de manière continue : 1) réduction, nous utiliserons le moins de souris possibles tout en veillant à obtenir des données statistiques significatives ; 2) raffinement, nous veillerons à optimiser les méthodologies pour éviter tout inconfort / douleur / détresse / angoisse aux animaux. Afin de préserver au mieux le bien être d'animaux, une attention constante sera déployée pour assurer la qualité des conditions de transport, d'élevage et d'hébergement des souris (période d'acclimatation, soins, état sanitaire, enrichissement du milieu, qualité de locaux d'expérimentation). Une surveillance accrue sera déployée après la neurochirurgie stéréotaxique (soins post-opératoires appropriés) pour diminuer au mieux (intensité et durée) la douleur occasionnée par l'intervention ; 3) remplacement, les études *in vitro* à partir des neurones du cervelet ne permettent pas l'examen de fonctions cognitives et motrices complexes. Néanmoins, nous développerons certaines expériences sur des tranches de tissus qui pourraient permettre d'évaluer morphologiquement ces cellules ; en particulier leur dynamique mitochondriale, diminuant ainsi le nombre des souris dédiées à des études histologiques.

11633 Nous travaillons sur les cellules souches musculaires chez les poissons, et nous avons mis au point un protocole d'extraction de ces cellules à partir de muscle de truites. Ces cellules sont en quantités plus importantes dans les jeunes stades (entre 2 et 25g). Etant donné que la reproduction des truites est saisonnière, nous souhaitons élever des truites depuis leur première alimentation avec une restriction alimentaire modérée afin de limiter leur croissance et ainsi pouvoir obtenir des poissons de 2 à 25g d'octobre à juin. Les salmonidés sont adaptés à supporter des périodes de restriction alimentaire sans stress tant que les besoins métaboliques de base sont couverts ce qui sera largement le cas ici (nourris à volonté 2 jours par semaine). Après une réalimentation normale pendant 2-3 semaines les poissons seront euthanasiés et nous prélevons le muscle pour extraire les cellules souches musculaires ce qui nous permet d'étudier les mécanismes d'action régulant leur prolifération et différenciation.

Remplacement : Le muscle de truite est la seule source de cellules souches musculaires et il n'existe aucune lignée musculaire chez les poissons.

Réduction : Nous limiterons le nombre de poissons restreints à 500 poissons par an, ce qui nous permet de faire 20-30 extractions de cellules.

Raffinement : Cette restriction alimentaire n'induit aucune souffrance à l'animal ni de stress physiologique

11634 Dans le cadre de la procédure de libération européenne, chaque lot de vaccins, pour être mis sur le marché, doit être contrôlé selon les protocoles et les spécifications décrits dans la Pharmacopée européenne (Ph Eur) et/ou les rapports techniques de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Ainsi, les méthodes pour le contrôle de l'activité biologique des vaccins multi-composés tétanos (T), diphtérie (D) et coquelucheux acellulaire (Coq Ac) sont des épreuves de virulence sur souris pour le tétanos, sur cobayes pour la diphtérie et un test d'immunogénicité sur souris pour la Coq Ac ; un test d'immunogénicité sur cobayes pour les 3 composés (T, D, CoqAc) est également disponible. L'objectif de cette étude est de développer un test d'immunogénicité sur souris pour le titrage de l'activité biologique de ces 3 composés. Cette étude permettra un raffinement des méthodes actuelles : suppression de l'administration des toxines tétanique et diphtérique et par conséquent suppression de la souffrance et une réduction du nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale : les 3 composés seront testés sur les mêmes animaux ; le nombre d'animaux a été défini par dose de produit en fonction des données disponibles pour le tétanos pour la méthode challenge et ainsi permettre une interprétation fiable des résultats. La mise en place et la validation de cette méthode nécessite 1135 souris pour un type de vaccin, l'étude portera sur 2 vaccins de fabricants différents soit 2270 souris. Le contrôle de l'efficacité des vaccins fait appel au système immunitaire, aucune méthode *in vitro* n'est disponible à ce jour pour remplacer cette fonction immunologique. Les souris sont hébergées sur de la litière enrichie de carrés de cellulose et de lanières cartonnées et seront suivies quotidiennement. Des points limites ont été mis en place pour apprécier les signes de douleur (prostration, perte de poids), le prélèvement de sang est réalisé sous anesthésie.

11635 Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche sur le diabète et l'obésité.

La physiologie de mammifère diurne est adaptée à une période d'activité le jour, pendant laquelle surviennent repas et exercice, en opposition à une période nocturne de repos et de jeûne chez le sujet normal.

Le concept de chronobésité, rattachée aux pathologies diabétiques et obésités, découle de l'hypothèse selon laquelle une désynchronisation chronique du cycle veille-sommeil et des rythmes circadiens (cycle d'environ 24 heures) favoriserait la surcharge lipidique. Les rythmes circadiens sont contrôlés par des oscillations moléculaires que l'on nomme "horloges". L'horloge circadienne principale se situe dans le cerveau, au niveau de l'hypothalamus, elle est synchronisée essentiellement par la lumière, mais également par d'autres facteurs (comportementaux,

pharmacologiques ou nutritionnels). En plus de cette horloge principale, des horloges secondaires situées dans les organes périphériques (foie, tissus adipeux, cœur) interviennent également dans le contrôle des rythmes circadiens. Le rythme des prises alimentaires serait régulé par une horloge alimentaire, une meilleure connaissance de la synchronisation alimentaire ouvrira la voie à de nouvelles approches thérapeutiques permettant de corriger les anomalies circadiennes délétères liées aux pathologies métaboliques telles que l'obésité et le diabète. Elle permettrait également de prévenir les troubles métaboliques induits par les désynchronisations dues aux modes de vie actuels (travail de nuit, travail posté, décalage horaire). Les stratégies employées devraient mettre à profit l'effet synchroniseur d'une planification et d'une composition des repas optimisées.

A l'inverse de l'homme, le rat a une période d'activité essentiellement nocturne et une période de repos diurne. Pour mener à bien cette étude, les rats seront soumis à un cycle inversé de 12h/12h : 7h00-19h00 (période nocturne ou d'activité) et 19h00-7h00 (période diurne ou de repos) qui nous permettra d'étudier le rôle de l'horloge alimentaire sur l'impact des désordres métaboliques. Nous utiliserons d'une part 60 rats Goto-Kakizaki (GK) génétiquement diabétiques et d'autre part 160 rats Sprague Dawley rendus obèses par un régime hyper lipidique.

Pour ce projet, dans un souci de raffinement nous veillerons en continu au bien-être des animaux avec un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement, en adéquation avec la règle des 3 R : Réduire pour diminuer le nombre d'animaux utilisés, Remplacer quand il est possible de travailler sur des cellules ou des tissus, Raffiner pour réduire, supprimer ou soulager la douleur ou la détresse des animaux.

11636 La stéatose hépatique d'origine non alcoolique (NALFD en anglais) est une maladie du foie très répandue associée à l'obésité. Elle est évolutive, les premiers stades se caractérisent par une accumulation de triglycérides dans le foie, qui se double d'une inflammation. Elle peut à terme se transformer en fibrose ou même en cirrhose. Aucun traitement n'existe pour ces stades avancés. Déterminer les voies qui contrôlent ces transformations peut permettre d'identifier des cibles pharmacologiques potentielles pour lutter contre ces maladies. ERR α (Estrogen Related Receptor alpha) est une protéine impliquée dans la biogénèse mitochondriale et le métabolisme des lipides, ce qui en fait un bon candidat pour prévenir la stéatose hépatique. L'objectif de ce projet est d'évaluer si ERR α est impliqué dans la synthèse des lipides dans le foie, en utilisant des souris qui n'expriment plus ERR α spécifiquement dans le foie. Nous soumettrons les animaux à un cycle de jeûne/réalimentation, une synthèse lipidique importante ayant lieu après réalimentation.

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

Le nombre maximum de souris prévu pour cette étude est de 96. Ce nombre a été déterminé de façon à pouvoir interpréter statistiquement les résultats obtenus, en tenant compte de la variabilité interindividuelle attendue dans ce genre d'étude. Il inclut la possibilité de répéter l'expérience une fois, ce qui ne sera pas fait si la première expérience est concluante.

Lors de la mise à jeun, les souris seront observées toutes les deux heures et des points limites adaptés ont été fixés de façon à éviter toute souffrance inutile des animaux.

11637 Les maladies neuromusculaires forment un groupe de maladies affectant le système locomoteur et comprenant des formes graves de myopathies et de myasthénies pouvant résulter en des atteintes musculaires permanentes, paralysie motrice, voire aboutir au décès des patients atteints. Ces maladies sont en majorité d'origine génétique et proviennent de l'altération des processus impliqués dans le développement ou la régénération des muscles striés squelettiques (ci-après nommés 'muscles'), ou des neurones moteurs de la moelle épinière (motoneurones) qui innervent le muscle. Par conséquent, la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les maladies neuromusculaires est un enjeu majeur de santé publique.

Nous avons identifié un gène qui joue un rôle essentiel dans le développement des terminaisons des cellules nerveuses (les axones) dans le système nerveux central. Le rôle de ce gène en dehors du système nerveux central est mal connu, cependant des éléments suggèrent fortement qu'il

pourrait être impliqué dans le développement du système neuromusculaire. En effet, il fait partie d'une famille de gènes impliqués dans le contrôle bioénergétique des cellules et qui jouent un rôle majeur dans les processus de maintien de l'homéostasie musculaire et de régénération du muscle.

Par conséquent, notre projet vise à identifier et à caractériser les rôles de ce gène dans le développement, l'homéostasie et la régénération du système neuromusculaire. Nos travaux permettront d'établir de nouvelles connaissances scientifiques et aboutiront à une meilleure compréhension des causes génétiques de maladies musculaires graves.

Ce projet est divisé en 3 procédures :

- La première procédure consistera en la création par croisements de lignées de souris porteuses de la mutation dans le gène que nous étudions, et dont la mutation s'exprime à différentes étapes clé du développement musculaire : pendant le développement embryonnaire, chez l'adulte, et pendant la régénération du muscle, ainsi qu'une lignée dans laquelle le gène d'intérêt sera inactivé dans le système nerveux contrôlant la locomotion. Nous caractériserons les conséquences de ces croisements pour déterminer si ces nouvelles lignées ont un phénotype dommageable, ce qui nous permettra le cas échéant de prendre les mesures adaptées de soins pour l'élevage et la manipulation de ces animaux.

- La seconde procédure aura pour but de tester les conséquences des mutations ainsi créées sur la fonction musculaire à l'aide de tests fonctionnels non invasifs.

- La troisième procédure visera à induire une lésion musculaire contrôlée sur un seul muscle, afin de suivre les mécanismes cellulaires sous tendant à la régénération musculaire et qui sont altérés dans des maladies du système neuromusculaire.

Ce projet sera réalisé chez la souris, une espèce dont le système musculaire est proche du muscle chez l'homme et dans laquelle la plupart des maladies du muscle peuvent être mimées. Nous estimons que ce projet mobilisera 662 souris.

Une attention particulière sera accordée à la règle des 3R :

- Réduire et remplacer : le projet étant réalisé en partenariat avec une autre équipe de l'Institut, chaque fois que ce sera possible nous coordonnerons les expériences réalisées par plusieurs expérimentateurs et dans la mesure du possible, nous procéderons à des prélèvements multiples sur le même individu. Les accouplements seront optimisés afin de produire strictement le nombre nécessaire de souris. Les analyses statistiques précédentes de l'équipe permettent d'ajuster le nombre d'animaux requis au minimum.

- Raffiner : les animaux seront maintenus dans les conditions standard d'hébergement et l'environnement sera enrichi. Lors des différentes procédures, un suivi régulier des animaux sera réalisé et pour toute manipulation susceptible d'entraîner du stress ou de la douleur, nous aurons recours systématiquement aux techniques d'analgésie et d'anesthésie.

11638 L'iontophorèse est une méthode qui permet d'administrer un médicament à travers la peau sous l'effet d'un courant de faible intensité. Cette technique peut être une voie alternative aux traitements oraux lorsqu'une concentration élevée d'un médicament est nécessaire localement mais qui, administrée en systémique (intraveineux), engendre des effets secondaires néfastes.

Dans le cadre de la prise en charge thérapeutique des ulcères cutanés, la iontophorèse de molécules capables d'améliorer la fonction vasculaire et la cicatrisation au niveau de la zone atteinte, pourrait constituer une alternative aux traitements oraux, en particulier si ces derniers sont responsables d'effets indésirables (hypotension, maux de tête...).

Ce projet est une étude de tolérance, de preuve de concept et de mise au point de modèles pour évaluer le potentiel thérapeutique d'un médicament sur la cicatrisation en contexte pathologique type diabète. En effet une hyperglycémie chronique induit des altérations structurales et fonctionnelles à l'origine d'une des complications bien connues du diabétique : l'ulcère diabétique.

Cette complication en fait la première cause d'amputation non traumatique des membres inférieurs. Nous évaluerons l'efficacité de l'administration par iontophorèse d'une molécule favorisant la cicatrisation (analogue de la prostacycline) sur le modèle murin streptozotocine (STZ). Il s'agit d'un

modèle murin couramment utilisés dans les études de cicatrisation diabétique. Le modèle STZ est un modèle de diabète chimiquement induit. Nous souhaitons observer l'implication, que nous supposons principale, de la voie des prostacyclines dans la cicatrisation par l'administration de l'analogue de prostacycline par iontophorèse. Comme le passage d'une molécule à travers la peau dépend de nombreux paramètres à la fois liés au courant, à la molécule concernée et à la structure de la peau, il est par conséquent très difficile de savoir si une molécule peut être administrée sans expérimentation sur un modèle animal.

Nous avons choisi de travailler sur la souris car la cicatrisation est un phénomène complexe utilisant beaucoup d'acteurs différents qui rendent impossible sa reproduction fidèle *in vitro* ou *in silico*. L'effectif des animaux utilisés, 544 souris, a été calculé en fonction de la puissance des tests statistiques prévus et des résultats intermédiaires attendus. Le suivi régulier des animaux sera réalisé pour s'assurer de leur bien-être. Nous utiliserons un tapis chauffant pendant les anesthésies ainsi qu'un gel lacrymal afin d'éviter des lésions oculaires dues aux anesthésies gazeuses répétées. Une grille d'évaluation de la douleur adaptée au comportement de l'animal sera utilisée et des analgésiques sont prévus pour soulager la souffrance (Buprénorphine en sous-cutané pour les chirurgies puis paracétamol dans l'eau de boisson).

11639 Les réponses immunitaires sont conditionnées par divers facteurs qui peuvent soit la renforcer, soit l'inhiber. Par exemple, la présence de microbes symbiotiques, les aliments ingérés qui peuvent moduler l'activité de bactéries intestinales, l'état de stress ou de fatigue d'un individu, peuvent tous influencer les réponses immunitaires. Un autre facteur potentiellement important est la mémoire d'une réponse immunitaire antérieure, codée soit par le système immunitaire, soit par le système nerveux par association, mémoire que l'on appelle Pavlovienne. Cette mémoire est bien connue pour l'association d'une réaction physiologique, comme la salivation, à un stimulus associé à de la nourriture, comme l'odeur. Des expériences effectuées dans les années 90 montrent qu'une mémoire Pavlovienne associe également l'inflammation à un stimulus indépendant, comme une odeur ou un goût. Nous proposons que ce type d'association pourrait induire des inflammations pathogéniques qui ne répondent pas directement à une infection ou une blessure. Plusieurs éléments sont nécessaires pour établir de telles associations : certaines cytokines produites par les cellules immunitaires, des neurones sensoriels et moteurs, et des centres d'association dans le cerveau tels que l'amygdale. Ce projet vise à explorer la puissance des associations Pavloviennes dans l'inflammation, et à terme, de bloquer ces voies associatives à des fins thérapeutiques ou de les renforcer afin de combattre les infections ou les tumeurs. L'étude de l'interaction complexe de plusieurs systèmes physiologiques ne peut se faire qu'*in vivo*. Des souris adultes des deux sexes seront utilisées (nombre total : 3460 souris). Nous proposons sept procédures expérimentales qui explorent l'immunité Pavlovienne (4 de sévérité légère, 3 de sévérité modérée). Aucune méthode de remplacement n'est envisageable pour l'étude de phénomènes physiologiques aussi complexes, mais nous limitons le nombre de souris au minimum statistique possible, et planifions des procédures dont le raffinement méthodologique est le produit de nos connaissances actuelles. Le raffinement visera à minimiser la souffrance animale lors des procédures expérimentales modérées (aucune procédure sévère). Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie profonde avec traitement analgésique pré- et post-opératoire. Les animaux seront gardés sur tapis chauffant pendant la chirurgie et jusqu'à leur réveil. Dans les procédures pouvant induire une douleur sur animaux vigiles, les molécules antagonistes pouvant supprimer cette douleur seront utilisés si besoin. L'état général des animaux sera surveillé régulièrement et des points limites adaptés ont été définis pour fournir des soins particuliers aux animaux ou arrêter les procédures lorsque des signes d'inconfort, de stress ou de souffrance seront détectés.

11640 Objectif global du projet : Caractérisation des effets des microplastiques issus d'un grand Estuaire sur la physiologie d'un poisson plat : la sole.

La production et l'utilisation croissantes de plastiques et leur dégradation conduit à l'émission de fragments appelés microplastiques (MP) quand leur taille est dans la gamme 1-5000 μm . La toxicité des MP pour la faune, et plus particulièrement pour les poissons plats, reste mal connue. Pour les

téléostéens, des premiers travaux montrent néanmoins des perturbations physiologiques au cours du développement. Outre leur toxicité intrinsèque, il a été démontré que les MP pouvaient aussi être vecteurs pour des polluants organiques.

Le présent projet a pour objectif d'étudier la toxicité des MP, directement prélevés dans l'environnement, pour les organismes aquatiques en répondant aux questions suivantes : Quelles sont les conséquences pour une espèce d'intérêt économique régional d'une exposition chronique à des MP directement issus de l'environnement ? A quel niveau ces conséquences seront-elles les plus visibles ? Serait-ce au niveau physiologique, cellulaire ou moléculaire ?

Les effets seront analysés après expositions expérimentales par voie trophique à des microplastiques liés à de l'aliment naturel. Ces microplastiques seront issus de macro-déchets plastiques collectés en Estuaire et finement broyés. Les approches utilisées allieront des analyses au niveau individuel (survie, croissance, comportement) et infraindividuel (métabolisme énergétique, système immunitaire, système digestif). L'espèce utilisée est la sole (*Solea solea*) et au total 1410 individus seront utilisés dans ce projet. Les effectifs ont été calculés à partir de données d'expérimentations précédentes et de la littérature pour assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés (Réduction). Pour réduire la souffrance et l'angoisse, les animaux sont manipulés uniquement sous anesthésie pour toutes les mesures individuelles, et seront toujours élevés en groupe dans des structures d'élevage adaptées à l'espèce avant et après l'application des procédures (Raffinement). Le Remplacement n'est pas possible dans le cas présent car nous étudions des fonctions intégratives des effets des microplastiques.

11641 L'insulinorésistance (IR) se définit comme une diminution de la réponse cellulaire et tissulaire à l'insuline, qui a pour conséquence une incapacité de l'insuline à réguler les métabolismes glucidique et lipidique. Les principales caractéristiques de l'IR sont des défauts d'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux et de la néoglucogenèse hépatique ainsi qu'un défaut de transport du glucose dans le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Les mécanismes à l'origine de l'IR sont mal connus, mais l'hypothèse principale implique un phénomène de lipotoxicité induit par des accumulations ectopiques de lipides. Ces désordres métaboliques sont associés à une réponse inflammatoire chronique dans les tissus adipeux caractérisée par une production anormale d'adipokines et de l'activation de divers processus pro-inflammatoires. De la même façon la présence d'une IR hépatique, associée à un processus inflammatoire, conduit au développement de NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Diseases, maladies hépatiques non alcooliques). Ainsi processus inflammatoires, IR, obésité, diabète de type 2 et NAFLD sont intimement liés.

La forte prévalence des NAFLD n'a fait qu'accentuer l'intérêt porté à cette pathologie ces dernières années. Ainsi différentes méthodes d'imagerie de la pathologie se sont développées afin notamment d'identifier son stade de développement. Toutefois si le diagnostic de la fibrose ou de la stéatose est aujourd'hui réalisable grâce à différentes modalités, le suivi de l'inflammation hépatique de manière non invasive est aujourd'hui impossible. L'inflammation étant au cœur des mécanismes de développement des NAFLD, et ce dès ses stades les plus précoces, il semble pourtant primordial d'être capable de l'évaluer.

Nous nous proposons donc d'évaluer un nouvel agent d'imagerie TEMP (Tomographie par Emission MonoPhotonique ou SPECT en anglais) spécifique de l'inflammation. Cet agent d'imagerie fait actuellement l'objet d'un transfert en clinique mais pour une indication autre que l'inflammation hépatique, et nous souhaitons déterminer s'il pourrait également avoir un intérêt pour l'imagerie de l'inflammation dans les NAFLD.

Lors d'une précédente étude conduite chez la souris, la preuve de concept de la faisabilité de l'imagerie du foie avec cet agent d'imagerie a été réalisée en utilisant un modèle d'inflammation hépatique aiguë induite par un régime alimentaire MCD carencé en deux acides aminés (la méthionine et la choline). Cette étude a permis de démontrer que l'agent d'imagerie permet effectivement de visualiser et de quantifier de manière non invasive l'inflammation hépatique. Cette preuve de concept ayant été faite, une étude pilote a ensuite été réalisée sur un second modèle murin plus contraignant à mettre en œuvre mais présentant des caractéristiques physiopathologiques des NAFLD plus proches de celles observées en pratique clinique. L'intérêt

d'utiliser ce nouveau modèle animal est double. Premièrement, ce modèle étant proche de la clinique, les données obtenues chez la souris seront plus prédictives de ce qui pourrait être observé chez l'homme. Deuxièmement, il est également plus adapté que le premier modèle utilisé pour évaluer l'effet de thérapeutiques. Les résultats obtenus à l'issue de cette étude préliminaire ont permis de valider la possibilité de faire de l'imagerie de l'inflammation hépatique sur ce nouveau modèle animal. Le présent projet, qui fait suite à cette étude pilote a donc pour objectif de poursuivre le développement de la méthode et de tester l'évolution de l'inflammation au cours du temps.

Au total 60 souris seront utilisées.

Tout au long des études *in vivo*, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). La mise au point d'un agent d'imagerie nécessite d'avoir recours à de l'expérimentation animale, toutefois nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Ces animaux seront hébergés par groupe, en cages avec enrichissement du milieu de vie. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de contrôler leur bien-être. Le régime alimentaire utilisé n'entraîne ni souffrance, ni de perte de poids. Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse en dehors d'un stress bref et modéré lié aux injections du radiotracer selon les bonnes pratiques vétérinaires.

11642 Notre équipe de recherche a pour but de développer de nouveaux types de marqueurs luminescents à base de lanthanides pour la détection de certains types cellulaires ou cancer en imagerie optique. Les principales techniques d'imageries utilisées pour le diagnostic (IRM, Scanner, PET...) représentent un coût en termes de temps (longue acquisition) et d'argent.

L'imagerie fluorescente n'est pas encore une technique d'imagerie utilisée en diagnostic car les tissus ont la propriété d'être auto-fluorescents dans la lumière visible. Pourtant elle offre une alternative et une complémentarité aux autres techniques couramment utilisées : optimisation de la sensibilité, besoin de faible quantité de marqueurs et le coût de l'appareil est moindre.

Après des expérimentations *in vitro*, le composé à base de lanthanides utilisé, a montré des résultats prometteurs dans le ciblage cellulaire.

Les molécules synthétisées au sein de notre laboratoire sont dérivées de familles décrites dans la littérature comme non toxiques, non immunogènes et excrétées par voie urinaire. Cependant, la structure chimique ayant été modifiée, ces nouvelles molécules peuvent avoir un comportement différent au niveau d'un organisme vivant.

Ici, l'étude sera portée sur différents types de complexes visant des tissus spécifiques : étude sur la biodistribution du marqueur par imagerie de fluorescence dans le proche infrarouge. 20 composés seront étudiés, pour cela 20 lots de 30 souris seront nécessaires (pour chaque composé : un groupe témoin n=10 souris sans injection, un groupe n=10 avec injection d'un marqueur commercial et un groupe n=10 souris avec injection de composé). Les souris seront soit de lignées Balb/c soit mutante nude. Concernant les groupes de souris témoin, il est nécessaire de prévoir un groupe témoin pour chaque composé car les composés peuvent être visualisés au microscope selon différents filtres avec des longueurs d'onde différentes ou simplement des temps d'exposition différents. Bien évidemment, si deux ou plusieurs composés sont étudiés simultanément, nous réduirons le nombre de souris témoin : 1 seul groupe témoin pour deux composés (en accord avec la règle des 3R).

Les molécules à tester sont dérivées de familles bien décrites dans la littérature (dendrimères, Metal-Organic Frameworks ou nanoparticules) comme non toxiques, non immunogènes et excrétées par voies urinaires. Cependant, la structure chimique ayant été modifiée, ces nouvelles molécules peuvent se comporter différemment ou avoir un ciblage particulier et il est donc nécessaire de les étudier sur un organisme vivant entier.

Le but final de ces études est de localiser un signal de notre marqueur dans les zones cibles en imagerie de fluorescence après injection du marqueur chez l'animal sain. L'imagerie par fluorescence présente l'avantage d'être non invasive, non irradiante et sans douleur pour l'animal (animal préalablement anesthésié) ce qui permet d'être en parfait accord avec la règle des 3R. Pour cette étude un nombre de 600 souris maximum sera nécessaire.

11643 Les patchs de couleur chez les animaux forment une catégorie majeure de signaux de communication qui reflètent fréquemment des traits de qualité individuels corrélés avec des facteurs génétiques et/ou avec la condition phénotypique. D'après la théorie en biologie évolutive, la fiabilité de l'information d'un signal de couleur peut être maintenue si un coût significatif est associé à sa production et/ou sa maintenance, par exemple, expliqué par son lien avec la sécrétion d'hormones. En effet, certaines hormones telles que la testostérone sont bien connues pour leur rôle dans le développement de caractères sexuels secondaires comme la coloration mais leur biosynthèse peut aussi avoir des effets néfastes sur l'organisme, comme une immuno-suppression ou une accélération de la sénescence. L'objectif de ce projet est d'étudier la relation entre l'expression des signaux UV sur la gorge de lézards mâles du lézard vivipare (*Zootoca vivipara*) et la sécrétion de testostérone (T) pendant une année du printemps 2019 au printemps 2020. Dans cette optique, nous procéderons en mai 2019 à une expérience dans laquelle nous augmenterons de manière non invasive le taux de T plasmatique de mâles sub-adultes du lézard vivipare (n = 45) par rapport à un lot témoin (n = 45). Pendant 15 journées consécutives, nous appliquerons quotidiennement une solution huileuse de testostérone (traitement) ou d'huile (témoins) sur le dos des lézards (méthode non-invasive). Immédiatement avant et après cette manipulation, nous effectuerons des mesures de morphologie, de couleur et de performance (force de morsure) afin de détecter d'éventuelles variations à court terme dues à l'augmentation de testostérone. Après cette manipulation, les lézards seront placés dans des cages en extérieur recréant un habitat semi-naturel jusqu'en mai 2020. Les lézards auront alors atteint la maturité sexuelle et développé leur couleur UV d'adulte. Pendant toute cette période, nous effectuerons des mesures régulières pour étudier le développement de la couleur UV au cours de la maturation sexuelle. Ce projet nous apportera ainsi de précieuses informations nous permettant de mieux comprendre comment les signaux UV se mettent en place. Le nombre d'individus prend en compte la mortalité naturelle en période hivernale (50-60%) pour un effectif réduit en fin de projet mais suffisant pour mener nos analyses statistiques. Les conditions d'élevage impliqueront un enrichissement des cages et des conditions climatiques correspondant au milieu naturel. Les protocoles seront raffinés par des contentions réduites en temps et des dispositions assurant la réduction du stress post-protocole. De plus, nous avons choisi d'utiliser la méthode la moins invasive possible pour augmenter la testostérone des lézards (i.e. application cutanée). Il n'est pas possible de remplacer le modèle biologique de cette étude par un équivalent cellulaire ou *in silico*.

11644 Les infections du système nerveux central sont associées à une importante mortalité et entraînent de fréquentes séquelles lorsque le patient survit à l'infection. Les nouveau-nés sont particulièrement sensibles à ce type d'infection et développent 30 fois plus fréquemment des infections bactériennes du système nerveux central que la population moyenne. Nous essayons de comprendre pourquoi. Une des interfaces barrière au niveau du cerveau pourrait être plus permissive aux bactéries chez les nouveau-nés que chez l'adulte. Notre projet consiste à inhiber chez le nouveau-né l'expression de certains facteurs que nous soupçonnons impliqués dans cette différence de fonction barrière entre le nouveau-né et l'adulte. Nous espérons ainsi renforcer la fonction barrière de cette interface du cerveau et réduire la sensibilité des nouveau-nés à l'infection de leur système nerveux central par les bactéries.

Cette étude devrait permettre une meilleure compréhension du développement de cette interface barrière qui reste encore très peu étudiée malgré son rôle important dans les infections du système nerveux central, et des mécanismes associés à la variation de fonction barrière de cette interface en fonction de l'âge.

Le recours à l'animal est nécessaire car il n'existe aucun système *in vitro* qui puisse reproduire la complexité cellulaire de l'interface barrière du cerveau que nous étudions. De plus, les différents facteurs variant selon l'âge et influant sur la fonction barrière de ce tissu ne peuvent être étudiés *in vitro*.

Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience d'études sur la fonction barrière et s'appuie sur des tests statistiques spécifiques qui nous permettent d'utiliser le nombre minimal d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé.

312 souris mâles et femelles, nouveau-nés et adultes seront utilisées sur 5 ans.

Trois procédures seront réalisées. Deux procédures consistent à inhiber les facteurs qui pourraient être associés à la variation de fonction barrière de cette interface particulière du cerveau à un stade antérieur à celui auquel nous testons et mesurons cette fonction barrière : la première, à un stade embryonnaire, la seconde, juste après la naissance.

Ces procédures occasionneront un inconfort et/ou une douleur modérée pour les animaux. Le niveau de sévérité attendu de ces procédures est modéré. Pour réduire stress, inconfort ou douleur, a) les chirurgies et injections seront réalisées sous anesthésie générale ; b) un analgésique sera administré au maximum la sensation de douleur et de stress, c) la manipulation des nouveaux nés sera réalisée avec soin pour éviter tout stress chez la mère ; d) des points limites ont été définis et les animaux seront régulièrement observés afin de les respecter. Les souris sont hébergées en groupe ou par portée, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification (papier, maison).

11645 Dans ce projet nous allons étudier la faisabilité d'une approche de thérapie génique pour l'hypophosphatémie liée à l'X (XLH). L'XLH est une maladie rare se traduisant principalement par une fragilité des tissus minéralisés (os et dents). Les patients sont de petite taille et souffrent de douleurs dentaires, osseuses, voire même de douleurs musculaires. Leurs os sont plus fragiles. Les patients présentent également de faibles niveaux de phosphate dans le sang ainsi que des niveaux de FGF-23 augmentés (facteur de croissance du fibroblaste 23). Le FGF-23 agit au niveau rénal en diminuant la réabsorption du phosphate dans le sang.

Il n'existe actuellement aucun médicament curatif de cette maladie, la prise en charge thérapeutique actuelle consistant en l'apport de phosphate et de calcitriol (forme active de la vitamine D, qui favorise l'absorption du phosphate dans les intestins). Néanmoins, ce traitement ne permet pas d'inverser complètement le phénotype : les os restent fragiles et déminéralisés, nécessitant dans les cas les plus sévères des opérations chirurgicales répétitives. La déminéralisation des dents favorise également l'apparition d'abcès, pouvant donner lieu à des infections. Par ailleurs, le traitement par apport de phosphate peut entraîner une hyperparathyroïdie.

Un modèle murin spontané de cette pathologie existe : les souris HypDuk. Ces souris reproduisent le phénotype observé chez les patients : petite taille, hypophosphatémie, augmentation des taux de FGF-23.

Nous avons développé une stratégie thérapeutique qui consiste à utiliser un virus adéno-associé (AAV) pour diminuer le taux de FGF-23 (AAV-FGF23). Les expérimentations consisteront à évaluer les effets de l'AAV-FGF23 sur des souris HypDuk. Afin de répondre à la règle des 3R, nos vecteurs viraux ont d'abord été testés *in vitro* (remplacement), afin de sélectionner les meilleurs candidats. Cependant, un organisme entier est nécessaire pour les étapes suivantes de l'évaluation de nos candidats.

Cette étude utilisera le minimum d'animaux possible pour avoir des résultats statistiquement interprétables (réduction). De plus, nous évaluerons le maximum de paramètres requis sur les mêmes animaux dans la même expérience pour limiter leur utilisation. Les prélèvements sanguins seront importants pour évaluer l'efficacité de nos vecteurs et seront réalisés au niveau de la veine mandibulaire afin de raffiner le geste (raffinement).

Dans ces études, nous prévoyons d'utiliser 234 souris. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'étude et en fonction d'une analyse statistique afin d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible.

11646 L'accélération actuelle du changement climatique affecte de façon particulièrement marquée la chaîne Pyrénéenne, processus auquel les territoires frontaliers doivent impérativement s'adapter. Le présent projet propose d'étudier plusieurs espèces d'ectothermes réparties le long de la chaîne pyrénéenne, de la rivière de plaine aux pierriers d'altitude, espèces considérées ici comme bio-indicateur des effets du changement climatique. Le projet générera des cartes de répartitions, nourries de données climatiques, topographiques et biologiques afin de rapidement (1) évaluer la réponse des bio-indicateurs de milieux vis-à-vis du changement climatique, (2) décrire la variabilité

naturelle du climat sur le temps long à l'échelle des territoires pyrénéens et (3) générer des outils prédictifs, à partir de la modélisation, des effets des changements climatiques sur les bio-indicateurs. Ces avancées fourniront un outil décisionnel, donc une aide au développement durable de la montagne, ainsi qu'une connaissance approfondie des écosystèmes pyrénéens. Le projet bénéficiera aux acteurs intermédiaires, décisionnaires locaux, communautés scientifiques et public transfrontalier dans son ensemble. Le projet se veut être une étape à l'avènement du développement territorial durable dans la chaîne des Pyrénées, tout en favorisant la perception de la zone transfrontalière par les citoyens et acteurs intermédiaires comme un espace unique à l'effet frontière diminué.

Durant les 4 années du projet, 3 espèces d'ectothermes pyrénéennes seront étudiées [la couleuvre vipérine, *Natrix maura* (N total = 673 ; 83 adultes + 590 juvéniles), le lézard des murailles, *Podarcis muralis* (340 adultes + 250 juvéniles = 590) le calotriton des Pyrénées, *Calotriton asper* (N = 200 adultes)], soit un total de 1463 animaux], à travers des analyses comportementales, génétiques ou expérimentales, afin d'améliorer nos connaissances sur ces espèces et de développer des modèles prédictifs adéquates. Les animaux seront capturés en milieu naturel, transportés puis maintenus en captivité pendant 2 mois maximum. Les animaux seront marqués (par PIT-tags ou à chaud) puis un bilan sanguin sera effectué par prise de sang afin de réaliser un bilan sanitaire des populations. Enfin, des tests de préférences thermiques spontanées, ainsi que des expériences sur l'adaptation à l'altitude (hypoxie naturelle liée à l'altitude) seront réalisés. Comme chacune des espèces cibles a une interaction unique avec son milieu, les différentes tâches du projet ne pourront être réalisées que sur les espèces étudiées, en veillant à respecter les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement.

Dans un but de remplacement partiel et de réduction, la mise en commun de données d'ores et déjà récoltées par de précédents projets permettront de réduire l'échantillonnage et le dérangement dans certaines populations chez 2 des 3 espèces étudiées (pour le calotriton des Pyrénées : données déjà récoltées dans 10 populations en 2009 ; pour la couleuvre vipérine, données de préférences thermiques déjà mesurées en 2011 qui seront réutilisées ici). Plusieurs individus seront capturés le long d'un gradient altitudinal afin de participer à des études expérimentales (préférences thermiques, adaptation à l'hypoxie). Dans un but de raffinement, ces animaux seront maintenus dans des conditions de captivité optimales respectant la réglementation européenne ainsi que leurs exigences biologiques (maintien en captivité dans des aquariums ou vivariums adaptés aux espèces, température des pièces contrôlées, mise à disposition d'eau et de nourriture en illimité). Le personnel compétent veillera à ce qu'un passage tous les deux jours soient effectués pour chaque espèce afin de vérifier les conditions de captivité des animaux. Toutes les données spécifiques à chacune des espèces seront par la suite implémentées dans les modèles prédictifs, et permettront de développer des outils décisionnels afin de proposer des mesures de conservation efficaces pour chacune des espèces considérées.

11647 Les troubles envahissants du développement, dont les troubles du spectre autistique (TSA) sont une maladie neurodéveloppementale dont la prévalence ne cesse d'augmenter et dont on ne connaît pas encore suffisamment la physiopathologie pour développer des stratégies thérapeutiques. L'objectif du projet est d'utiliser différents modèles animaux de l'autisme (souris C57/Bl6) afin de caractériser au niveau anatomique, cellulaire et moléculaire les régions cérébrales impliquées dans la motricité, qui n'a que peu été réalisé auparavant, afin d'identifier les perturbations et les réseaux neuronaux responsables de ces symptômes.

Ce projet pourrait permettre de mieux comprendre l'étiologie de cette pathologie psychiatrique neurodéveloppementale qui est à ce jour encore très mal connue. Ainsi, cette caractérisation pourrait également ouvrir une nouvelle voie dans le diagnostic quantitatif de ces troubles et suggérer des nouveaux moyens thérapeutiques.

Les modèles animaux de souris dans ces pathologies se sont révélés d'une grande utilité car ils permettent l'analyse des réseaux neuronaux et la détermination des messagers chimiques qui sous-tendent les maladies cérébrales. La souris, et plus spécifiquement la souche C57/Bl6, est très utilisée comme modèle animal de troubles neurologiques et psychiatriques. De plus, l'utilisation de

cette espèce ouvre la porte à l'utilisation de souris transgéniques portant des mutations spécifiques en phase avec notre projet de recherche sur l'autisme. Les rongeurs sont à ce jour les espèces modèles de petite taille ayant un système nerveux proche de l'Homme.

Une attention particulière est portée afin d'être en conformité aux 3R.

Remplacer : Ces approches nécessitent la présence du réseau neuronal qui est uniquement accessible dans des modèles d'animaux intègres et donc vivants. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier.

Réduire : (i) nous avons rédigé un protocole expérimental rigoureux avant toute expérimentation, (ii) nous avons entrepris de réduire aux maximum le nombre d'animaux en planifiant des expériences qui nous semblent absolument nécessaires pour répondre à nos objectifs scientifiques. (iii) Nous mettrons en place des tests statistiques performant : ANOVA multi factorielle (âge, sexe, traitement) suivi de tests "post-hoc" de comparaison de moyennes de deux échantillons avec ajustement de l'erreur comme celui de Newman-Keuls que nous employons régulièrement pour ce type d'études.

Raffiner : (i) nous avons planifié nos expériences en gardant à l'esprit la nécessité de réduire sinon de soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux, et (ii) dans le but d'obtenir plus d'informations pertinentes à moindre coût en terme de "mal être" animal. Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape.

Ainsi, et d'après nos estimations, nous aurons besoins de 223 souris.

11648 Les vaisseaux sanguins et lymphatiques forment des réseaux essentiels pour le transport de fluides, de gaz, de macromolécules et de cellules dans l'ensemble du corps. Des dysfonctionnements lors de la formation de ces vaisseaux sanguins et lymphatiques (angiogenèse et lymphangiogenèse) ainsi qu'au niveau du maintien de l'équilibre des systèmes cardiovasculaire et lymphatique sont la cause de nombreuses pathologies. Des travaux préliminaires chez la souris indiquent que l'absence de deux protéines impliquées dans la croissance cellulaire entraîne un défaut de formation des vaisseaux au niveau de la rétine chez les nouveau-nés ainsi que des défauts de la vascularisation pulmonaire et cardiaque chez l'adulte. Cette étude vise à approfondir la compréhension du rôle de ces facteurs de croissance sur la fonction cardiaque. Ces processus sont complexes et engagent différents acteurs (différents organes, différents types de cellules et autres facteurs de croissance) qui ne peuvent pas être remplacés par un test *in vitro* ou par une étude *in silico*. Le recours à des investigations *in vivo* est donc nécessaire. Le modèle rongeur a été choisi pour réaliser cette étude et plus particulièrement des souris double KO pour ces deux protéines.

Les animaux sont nés et élevés dans un établissement agréé. Ils sont hébergés en groupe et en milieu enrichi de modules permettant d'améliorer leurs conditions de vie. Nos collaborateurs sont responsables de l'élevage de ces souris qui présentent, selon les études préliminaires réalisées, un phénotype non dommageable. Le but du présent projet pour nous sera d'évaluer l'impact potentiel de cette double délétion au cours du temps sur l'anatomie et la fonction cardiaque des souris par imagerie échographique. Ce type d'imagerie est totalement non invasive et elle fait référence comme technique *in vivo* d'évaluation de la fonction cardiaque. Le protocole d'imagerie échographique qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse, il est relativement court (20-30 minutes d'acquisition d'images), réalisé sous anesthésie gazeuse légère et ne nécessite aucune injection. La température des animaux sera monitorée et régulée durant les acquisitions, et les animaux retourneront dans l'animalerie après leur réveil. Ce type d'imagerie permet de réaliser un suivi au cours du temps des mêmes animaux, réduisant par là même le nombre d'animaux nécessaire à une étude.

Au total, 80 souris seront incluses dans ce protocole d'imagerie. Tout au long du présent projet *in vivo*, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Nous limiterons le projet aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal. Ainsi, le nombre minimum d'animaux permettant le recueil de données statistiquement exploitables sera utilisé. Les souris seront hébergées par groupe, avec enrichissement du milieu de vie. Les animaux seront

suivis quotidiennement afin de contrôler leur bien-être. Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse.

11649 L'exposition des populations aux iodes radioactifs rejetés lors d'accidents de réacteur d'une centrale nucléaire peut être responsable en l'absence de mesures de protection adaptées de l'apparition de cancers de la thyroïde, en particulier chez les nourrissons et les jeunes enfants. Les conséquences sanitaires peuvent néanmoins être limitées par la mise en œuvre de mesures de protection, telles que la mise à l'abri des populations, leur évacuation, la mise en place de restrictions de consommation alimentaire et enfin, l'ingestion de comprimés d'iode stable.

Le présent projet de recherche propose de déterminer les modalités d'administrations répétées d'iode stable en situation de rejets radioactifs chroniques, de faire évoluer l'actuelle autorisation de mise sur le marché des comprimés d'iodure de potassium dosés à 65 mg, et enfin d'évaluer les effets indésirables d'administrations répétées d'iode stable sur les grandes fonctions physiologiques de l'organisme. Les expérimentations seront réalisées sur le rat wistar qui constitue un des modèles de référence pour les études de pharmacologie et de toxicologie de l'iode. Ce projet, articulé autour d'un protocole nécessite un nombre maximal de 58 animaux. De l'iode stable sera administrée à de jeunes rats (après sevrage) une fois par jour pendant 8 jours consécutifs afin de déterminer les effets de cette prise sur le court terme. Les animaux seront mis à mort le lendemain du dernier jour de gavage sous anesthésie générale.

Les résultats issus des travaux mis en œuvre dans le cadre de ce projet permettront à termes de proposer aux autorités sanitaires de nouvelles solutions opérationnelles pour la prévention des expositions aux iodes radioactifs et bénéficieront ainsi à l'évolution de la « doctrine iode ». De plus, les nouvelles recommandations françaises issues de ces travaux scientifiques innovants pourront faire évoluer les « doctrines iode » au niveau international avec pour bénéfice une harmonisation des pratiques en la matière.

Cette étude prend en compte la règle des 3 R :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution *in vitro* pour étudier l'impact de l'iode stable sur le métabolisme général d'un individu. La rat wistar constitue un des modèles de référence pour les études de pharmacologie et de toxicologie de l'iode car il présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observables chez l'homme.

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

Raffinement : la méthode utilisée (gavage) est peu invasive, rapide à effectuer et n'induit aucune douleur. Les animaux seront hébergés dans des cages contenant un tunnel ainsi que des bâtons de bois afin qu'ils puissent ronger, ce qui est un comportement caractéristique de leur espèce.

11650 Contexte : L'insuffisance cardiaque se traduit par un mauvais fonctionnement du cœur et est une maladie fréquente et invalidante, en pleine expansion dans notre société notamment en raison des maladies d'obésité et de diabète. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans cette dysfonction contractile induite par un syndrome métabolique représente un challenge important pour les chercheurs et les cliniciens afin d'améliorer la qualité de vie des patients.

Objectifs : Dans la cellule du cœur, la mitochondrie, une structure importante pour la production d'énergie, et le réticulum, une autre structure servant entre autres de réservoir de calcium, semblent pouvoir communiquer notamment pour échanger des informations. Notre projet a pour objectif général de mieux comprendre le rôle de ces communications et leur possible dérégulation lors de troubles du métabolisme comme le diabète et l'obésité. Nous travaillerons avec des modèles murins d'obésité (souris leptine-déficientes) et de diabète (souris soumises à un régime riche en gras et en sucre pendant 4 mois). Nous étudierons par des méthodes non-invasives la sensibilité de ces souris au glucose et à l'insuline ainsi que leur fonction cardiaque. Par ailleurs, nous chercherons à mieux comprendre le mécanisme d'altération des communications entre réticulum et mitochondrie par une technique innovante d'imagerie. Enfin, nous évaluerons le potentiel effet cardioprotecteur d'un

retour à une diète standard (de 1 à 3 mois) chez les souris diabétiques. Ce projet comporte donc 4 procédures pour un total de 455 souris sur 5 ans.

Conformité de la règle des 3R :

Remplacement : Notre projet ayant pour but d'étudier l'impact du syndrome métabolique sur la fonction cardiaque, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire. De plus, celui-ci s'appuie sur des résultats préliminaires obtenus *in vitro* sur cellules cardiaques isolées.

Réduction : Le nombre d'animaux par procédure a été calculé à l'aide d'un logiciel de statistiques afin de déterminer le plus précisément possible le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, soit 455 animaux sur 5 ans. Afin d'optimiser le recours aux animaux, ces derniers participent à plusieurs protocoles tout en veillant à minimiser au maximum la gêne et l'angoisse que cette succession de protocoles (pas ou peu invasifs) pourrait induire. De plus, le prélèvement d'organes autre que le cœur, à savoir foie et cerveau, sera réalisé dans le but d'établir des résultats préliminaires pour d'autres études au sein de notre laboratoire.

Raffiner : Les conditions d'hébergement des souris sont optimisées pour assurer un confort des animaux aussi bien à leur arrivée qu'en post-opératoire (enrichissement, respect des groupes sociaux, soins et suivi post-opératoires). Afin de supprimer la souffrance et la douleur, la chirurgie d'injection de virus dans le cœur est entièrement réalisée sous anesthésie générale avec prémédication analgésique et anesthésique local.

11651 Les anticorps monoclonaux (AcM) sont des molécules dérivées du système immunitaire qui ont un fort potentiel thérapeutique (thérapies ciblées). Une quarantaine sont utilisés pour traiter le cancer et les maladies inflammatoires et plus de 300 sont en cours de test clinique. Ils sont maintenant aussi considérés avec un intérêt grandissant pour traiter les infections virales graves comme celles par le virus du SIDA, Virus de la grippe, Ebola, Zika. Cependant, leurs conditions d'utilisation ne sont pas encore optimisées. L'amélioration des immunothérapies par des AcM est donc un enjeu médical majeur. L'une des découvertes importantes de ces dernières années a été la mise en évidence que le traitement par des AcM des animaux infectés et/ou développant des tumeurs, peut induire des effets dits "vaccinaux" à long-terme. En d'autres termes, les animaux infectés, ou présentant des tumeurs, et traités par AcM survivent en bonne santé grâce à l'induction d'une forte réponse immunitaire protectrice dirigée contre le virus et/ou la cellule tumorale. Dans ce cadre, il est maintenant important d'identifier les mécanismes impliqués afin d'optimiser, à terme, l'efficacité thérapeutique des futures thérapies par AcM. Ceci, qui est le but principal de l'ensemble de nos recherches, n'est pas réalisable chez l'Homme. Pour progresser dans cette perspective les expérimentations animales sont donc indispensables.

Nos études portent sur des modèles animaux (rongeurs) d'infections virales. Les animaux utilisés sont des souris pour lesquels des données scientifiques de la réponse immunitaire sont bien établies et des nombreux outils sont disponibles pour étudier de façon approfondie la réponse immunitaire, ceci avec un recul statistique. En utilisant ces modèles, nous évaluons les mécanismes d'action des AcM chez des animaux infectés et traités par AcM thérapeutiques. Des études sont bien entendu réalisées en parallèle chez des animaux contrôles qui servent de référence. La compréhension des mécanismes impliqués dans l'induction d'une telle réponse immunitaire protectrice à long-terme par les AcM permettra le développement de thérapies antivirales et anticancéreuses plus efficaces. Ceci se traduira par un bénéfice direct pour les patients.

Une attention toute particulière sera donnée à la réduction du nombre d'animaux par des études statistiques a priori. Les méthodologies utilisées prendront en compte le suivi des points limites pour interrompre l'expérimentation le plus tôt possible et minimiser douleur et détresse des animaux. Par ailleurs, tous les animaux bénéficieront d'un suivi régulier (quotidien), d'une attention et des soins réguliers pour assurer leur bien être tout au long des études. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux.

La réalisation du projet nécessitera au maximum l'utilisation de 864 sur 3 ans.

11652 L'audition nous permet, non seulement d'identifier et de localiser les sources sonores dans l'environnement, mais elle est également primordiale pour notre communication dans la société. A ce titre, la perte de l'audition peut rapidement placer la personne en situation de handicap (sensoriel comme social). En outre la surdité est le déficit sensoriel le plus fréquent chez l'Homme et touche plus de 280 millions de personnes dans le monde (www.who.int/pbd/deafness/en/). En France, un enfant sur 700 naît avec une surdité sévère ou profonde, et un enfant sur 1000 deviendra malentendant avant l'âge adulte. Aujourd'hui, on estime qu'environ 80% des cas de surdité neurosensorielle ont une cause génétique. Cependant, il n'existe aucun traitement curatif des surdités neurosensorielles. A ce jour les approches cliniques utilisées pour pallier les déficits auditifs chez l'Homme sont l'utilisation d'amplificateur de son, dans le cas des surdités légères, et la pose chirurgicale d'un implant cochléaire pour les surdités sévères ou profondes. Ces traitements sont loin d'être parfaits, en particulier dans des environnements bruyants. Une des alternatives envisageables est la thérapie génique. Cette technique vise à remplacer ou modifier un gène défectueux pour restaurer l'expression de la protéine déficiente. Nos investigations récentes ont montré que la thérapie génique restaure l'audition chez des souris modèles de la surdité humaine DFNB9. Cette surdité est due à une mutation dans le gène codant pour l'otoferline. Les souris déficientes pour l'otoferline (Otof^{-/-}) sont caractérisées par une surdité profonde associée à une dégénérescence des neurones auditifs primaires. Nous avons montré que la thérapie génique restaure l'audition chez les souris Otof^{-/-} sans pourtant préserver la totalité des neurones auditifs réduisant ainsi l'effet de la thérapie génique. La préservation des neurones chez ces souris pourrait potentialiser l'effet de thérapie génique. L'objectif de ce projet de recherche est de déterminer si un candidat-médicament actuellement au stade d'étude clinique, est capable de prévenir la dégénérescence neuronale chez les souris Otof^{-/-} et ainsi potentialiser l'effet de la thérapie génique chez ces animaux.

Prêt de 95% du génome de la souris est identique à celui de l'Homme. A ce jour, nous ne disposons ni de lignées cellulaires ni de cellules souches de l'oreille interne, à cause de la complexité anatomique et histologique de l'organe de l'audition. Le modèle murin reste le seul moyen pour étudier la physiopathologie des surdités et mettre au point des traitements curatifs. De plus, le modèle murin utilisé dans ce projet mime fidèlement la surdité humaine DFNB9.

Ce projet est une étude pilote qui nous permettra de mettre au point la procédure sur un nombre restreint d'animaux (40 souriceaux mâles ou femelles de 6 jours à 20 jours) sous la supervision du vétérinaire responsable du bien-être animal, et de vérifier sa faisabilité sur un plus grand nombre d'animaux.

Le seul geste expérimental contraignant est la répétition d'administration intra-œsophagienne de courte durée (10 secondes). Cette procédure est de degré de sévérité modéré et doit s'effectuer sur des animaux vigiles pour permettre le réflexe de déglutition ; l'anesthésie n'est donc pas possible, mais le geste sera réalisé par des personnes compétentes sous la supervision du vétérinaire responsable du bien-être animal. Les souris seront surveillées et pesées quotidiennement.

Tous les efforts seront déployés pour s'assurer que l'inconfort, la détresse et la douleur soient réduits au minimum. Si les souris présentent une perte de poids de plus de 10%, elles seront mises à mort.

11653 Contexte : Le choc septique constitue le stade le plus grave de l'infection. Malgré les nombreux progrès réalisés en médecine, il reste grevé d'une mortalité de 30 à 45 %. Parmi les mécanismes responsables des dysfonctions d'organes du choc septique, les lésions des mitochondries occupent une place centrale. En particulier, une lésion des enzymes de la chaîne respiratoire des mitochondries pourrait être une manifestation précoce des défauts de perfusion et entretiendrait ensuite la dysfonction d'organes si la dysfonction mitochondriale se pérennise. Néanmoins, la temporalité de cette succession d'évènements, cruciale pour conditionner l'opportunité des différents traitements potentiels, n'est actuellement pas établie. Chez le rat en choc septique aigu (18-24h) non réanimé, le fonctionnement mitochondrial (évalué par quatre techniques complémentaires) n'est pas altéré, et ce malgré des perturbations profondes de la perfusion et de

l'oxygénation des tissus. Chez le rat septique réanimé, une équipe a décrit une atteinte mitochondriale sévère dans les muscles prélevés après 48h alors que la perfusion systémique était rétablie depuis plus de 24h. Chez les animaux survivants, l'activation d'un phénomène de récupération (l'hormèse mitochondriale) permettait le retour à la normale de la fonction des organes.

Objectifs : Déterminer dans un modèle de choc septique réanimé chez le rat, à quels moments apparaissent la dysfonction mitochondriale puis l'activation de l'hormèse mitochondriale après constitution de l'hypoperfusion des tissus. Nous axerons principalement notre recherche sur le muscle strié squelettique locomoteur et respiratoire.

Méthodologie : Les rats seront rendus septiques par péritonite (ligature et perforation caecale [LPC]), puis ils seront réanimés, évalués sur le plan hémodynamique (pression artérielle, échographie cardiaque) et finalement mis à mort à différents temps expérimentaux pour évaluer le fonctionnement mitochondrial.

Nombre de rats nécessaires : 75

Eléments des 3R mis en œuvre :

Réduction : nous nous limiterons aux seules expérimentations jugées indispensables, le calcul du nombre d'animaux nécessaires est fondé sur des résultats préliminaires de notre critère d'évaluation principal, les expériences seront réalisées sur des groupes homogènes d'animaux afin de réduire la variabilité des résultats et enfin, nous procéderons à une exploitation maximale des données obtenues lors de l'expérimentation. Le nombre d'animaux témoins est ainsi réduit au minimum statistiquement acceptable.

Raffinement : nous nous attacherons d'une part à réduire et à soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux et d'autre part à obtenir le maximum d'informations pertinentes à moindre coût en terme d'inconfort animal. L'induction et l'entretien de l'anesthésie seront réalisés par voie inhalatoire (Isoflurane 3,5 à 4,5% afin d'obtenir une anesthésie chirurgicale [niveau 2], attestée par une abolition du réflexe de clignement, une abolition du réflexe de retrait de la patte, une fixité des pupilles et une respiration régulière) et seront associées à une analgésie systémique par Tramadol administré en sous-cutané (12,5mg/kg). En cas de signe d'inconfort pendant l'expérience (réaction motrice à la stimulation douloureuse d'une patte), l'anesthésie sera approfondie par augmentation de la fraction inhalée d'isoflurane et administration de boli supplémentaires de tramadol (12,5mg/kg sous-cutané). Avant toute incision cutanée, une infiltration sous cutanée de lidocaïne hydrochloride 0.1 ml sera réalisée. La température corporelle sera surveillée à l'aide d'un thermomètre rectal. Les rats seront réchauffés sur table chauffante afin de maintenir une température rectale entre 36°8C et 37°8C. La température ambiante de la pièce est supposée fixe. Des injections itératives de Tramadol 12,5 mg/kg, par voie sous cutanée seront réalisées toutes les 6 heures pendant 48h. Cette préoccupation sera constante avant, pendant et après réalisation des expérimentations. Nous respecterons des points limite en adéquation avec les objectifs de l'expérimentation. Les soins pré, per et postopératoires seront conformes aux standards et l'administration d'antalgiques adaptée à l'intensité de la douleur provoquée ainsi qu'au modèle choisi. La méthode de mise à mort sera également conforme aux recommandations. Le choix du modèle choisi (CLP chez le rat réanimé) est le plus pertinent pour étudier la pathologie (choc septique) objet de la recherche.

Remplacement : le remplacement n'est pas réalisable dans cette étude du phénomène complexe qu'est le choc septique. Sa réplique *in vitro* ou *in silico* n'est pour l'instant pas envisageable.

Résultats attendus : Si elle peut être établie, la temporalité précise des événements successifs (hypoperfusion tissulaire, dysfonction mitochondriale fonctionnelle puis récupération [mitohormèse]) permettra d'introduire aux meilleurs moments, les éléments de l'arsenal thérapeutique disponibles.

11654 La transplantation pancréatique est un des meilleurs traitements du diabète de type 1 instable du sujet jeune. Les progrès techniques chirurgicaux et immunologiques, associés à une sélection minutieuse des donneurs, ont permis de diminuer la morbidité de cette transplantation. Le nombre de transplantation pancréatique reste cependant limité du fait d'une pénurie de transplants et d'une morbidité post opératoire qui reste non négligeable.

Dans ce contexte de pénurie de transplants, le recours à des donneurs de plus en plus marginaux se développe. La perfusion pulsatile hypothermique a clairement maintenant montré son intérêt concernant les transplants rénaux issus de donneurs à critères étendus (donneurs de plus de 60 ans ou donneurs entre 50 et 59 ans avec 2 facteurs de risques sur 3 parmi : décès de cause cérébro-vasculaire, antécédent d'hypertension artérielle, créatinine supérieure à 150 µmol/L lors du prélèvement).

Les premières perfusions expérimentales de transplants pancréatiques canins ont été publiées il y a plus de quarante ans avec des résultats peu encourageants du fait d'un œdème majeur consécutif à la perfusion. Dans ce contexte, la conservation statique hypothermique des transplants pancréatiques reste la méthode de référence. Le pancréas est un organe fragile très sensible aux barotraumatismes. Un œdème interstitiel de la glande peut conduire à une thrombose veineuse complète entraînant l'échec de la transplantation. De ce fait, très peu d'études se sont intéressées à la conservation pulsatile hypothermique des pancréas et concernaient principalement la perfusion en vue d'une isolation d'îlots. La perfusion hypothermique de pancréas pourrait permettre une amélioration des conditions de préservation et d'évaluer la qualité des transplants, permettant ainsi d'améliorer les résultats des transplantations pancréatiques.

Notre équipe a précédemment réalisé une étude de perfusion hypothermique, après autorisations réglementaires, sur des pancréas humains récusés, pour cause de mauvaise qualité du greffon, pour une transplantation d'organes vascularisés ou isolement d'îlots.

Cette étude a permis de définir 1) des paramètres de perfusion pulsatile hypothermique et 2) d'évaluer les caractéristiques morphologiques, histologiques et fonctionnels *ex vivo*, des greffons après perfusion, montrant des transplants non altérés.

L'objectif de ce projet est de comparer, sur modèle porcin, la conservation statique et la perfusion pulsatile hypothermique *ex vivo*, avant allo-transplantation et leur éventuel impact sur la transplantation secondairement. A plus long terme, l'objectif est un transfert de cette procédure de perfusion pré-transplantation chez l'homme, dans le but d'améliorer les critères de sélection des transplants pancréatiques.

Le nombre maximum estimé d'animaux (porcs) nécessaire à ce projet est de 48 animaux comprenant donneurs et receveurs d'organes. Le nombre d'animaux potentiellement utilisés pourra être réduit en fonction de la méthode d'induction choisie du diabète, et en fonction des temps de conservation/perfusion du greffon dans les différents groupes.

Selon leur taille, les animaux peuvent être hébergés par 1, 2 ou 3 par boxes, au sein d'une même pièce. Les boxes sont ouverts, permettant une relation sociale entre les animaux.

De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures sont réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur est donné de façon adaptée en fonction de la procédure.

11655 Nous avons montré un impact significatif d'une exposition chronique à de faibles doses de certains pesticides in cellulo sur la prolifération de lignées de cancer colorectal et *in vitro* sur les formes neurotoxiques associées aux maladies neurodégénératives (données confidentielles non publiées).

Notre objectif est d'évaluer l'impact d'une exposition chronique à de faibles doses de ces pesticides sur le cancer colorectal et la maladie d'Alzheimer.

La collaboration entre nos 2 équipes spécialisées en cancers digestifs et maladies neurodégénératives, permet d'appliquer la règle des 3R :

1. Remplacement : nos données in cellulo et *in vitro* suggèrent un impact potentiel de ces pesticides *in vivo*.

2. Réduction : l'étude sera réalisée selon 3 phases sur un total de 510 souris (sauvages et transgéniques) pour étudier l'impact des pesticides sur les 2 maladies : la phase 1 (étude pilote) sera déterminante pour réajuster si nécessaire, les doses de pesticides et le nombre d'animaux afin que les données des phases 2 et 3 soient statistiquement valides.

3. Raffinement : les données publiées par les industriels n'indiquent aucune toxicité à la dose de 0.1ug/L (dose max autorisée dans l'eau potable par l'UE et dose max utilisée dans l'étude). Il n'est donc pas attendu de souffrance chez l'animal. Les animaux (10/lot ; 4/cage) seront hébergés sous surveillance quotidienne, dans un milieu enrichi, avec un accès illimité à la nourriture et à l'eau de boisson, avec ou sans pesticides.

11656 Les troubles fonctionnels intestinaux (TFI), en particulier la dyspepsie fonctionnelle (DF) et le syndrome de l'intestin irritable (SII), sont un problème majeur de santé publique vu leur forte prévalence et les coûts élevés en soins de santé qui leur sont associés. Ces troubles sont caractérisés par un trouble de la sensibilité viscérale que l'on nomme l'hypersensibilité viscérale, qui est identifiée par l'apparition d'une douleur lors de la distension d'un ballonnet dans le tube digestif, sans trouble de la compliance associée, alors que les sujets sains ne ressentent pas de douleurs pour des volumes identiques. Bien que les TFI puissent être isolés, une partie de ces patients présentent un chevauchement de différents troubles. En particulier, la DF et le SII coexistent fréquemment. La physiopathologie du chevauchement entre TFI n'est pas complètement élucidée. Une des pistes est la sensibilisation croisée, dont le mécanisme sous-jacent semble être principalement neurologique. Parmi les mécanismes impliqués dans l'hypersensibilité viscérale, la sensibilisation centrale est un phénomène largement évoqué dans la littérature (c'est-à-dire que l'amplification du signal sensitif se produirait dans la moelle épinière), la sensibilisation correspondant au fait de rendre le tube digestif sensible à une action physique ou chimique. Les médiateurs impliqués dans la transmission des influx douloureux, et donc possiblement en cause, sont en particulier les récepteurs NMDA, ainsi que les récepteurs TRPV1, TRPA1 et NK1. Enfin, la transmission du message nociceptif est également soumise à une importante régulation par des centres nerveux supérieurs faisant intervenir notamment les récepteurs opioïdes μ .

Dans ce contexte, l'objectif de notre projet est d'étudier la sensibilisation croisée entre l'estomac et le côlon à l'aide d'un modèle de sensibilisation chronique par irritation chimique chez le rongeur. Cette étude nous permettra d'une part d'évaluer si une sensibilisation croisée estomac-côlon existe et d'autre part d'identifier les mécanismes périphériques et centraux potentiellement impliqués dans sa physiopathologie, au moyen notamment de l'administration d'antagonistes de différents récepteurs connus comme étant impliqués dans la modulation de la transmission du message nociceptif viscéral (récepteurs TRPA1 en particulier). L'animal utilisé sera le rat de laboratoire (Sprague Dawley mâles de 8-10 semaines). Le toxique utilisé pour induire l'hypersensibilité gastrique ou colique sera différent selon l'étage impliqué (acide acétique pour le côlon et iodoacetamide pour l'estomac). La sensibilité viscérale sera évaluée à l'aide d'un barostat : des ballonnets infiniment compliants seront introduits en trans-rectal et en intra-gastrique pour les tests de distension.

Un modèle animal est nécessaire puisqu'aucun modèle *in vitro* ne permet d'étudier une réaction à la douleur. Nous avons par ailleurs choisi un animal n'ayant pas des caractéristiques digestives et neuro-anatomiques trop éloignées de l'Homme pour que les résultats observés puissent être plus facilement transposables aux pathologies humaines. L'injection des toxiques ne sera pas douloureuse (injections intra-rectales réalisées sous sédation et irritant gastrique ajouté à l'eau de boisson). Par contre, nous nous attendons à induire des douleurs modérées chez les rongeurs lors de la mesure de la sensibilité viscérale. La distension gastrique sera réalisée sous anesthésie générale à l'aide d'un hypnotique alors que l'étude de la sensibilité au cours du test de distension colorectale ne nous permettra pas d'avoir recours à des thérapies antalgiques per-opératoires pouvant induire des biais expérimentaux évidents. Toutefois, la mise en place du ballonnet de distension sera réalisée sous anesthésie par Isoflurane afin de limiter l'inconfort des animaux.

Nous avons pris en compte les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (principes des 3 R) lors de la conception de cette étude :

- Nous estimons le nombre d'animaux nécessaires à la mise en évidence d'une sensibilisation croisée estomac-côlon chez des rats sains à environ 12 rats par groupe. En tenant compte d'une inefficacité de la sensibilisation d'environ 10% parmi les animaux sensibilisés, l'ensemble du projet nécessitera 51 rats répartis en 4 groupes. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous

utiliserons les mêmes rats contrôles pour les distensions gastrique et colique afin de limiter le nombre de rats nécessaires ; les animaux réutilisés n'auront pas subi de stress douloureux modéré ou sévère (mise en place du ballonnet de distension sous sédation) et seront utilisés dans une procédure sans réveil (anesthésie terminale). En outre, les différents prélèvements biologiques seront également réalisés sur ces mêmes animaux dans le même but.

- Concernant le remplacement, il est justifié d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet puisque aucune méthode ne permet à ce jour de s'affranchir de l'expérimentation animale concernant l'étude de l'hypersensibilité viscérale, le paramètre principal évalué étant la sensibilité viscérale en réponse à un stimulus nociceptif par distension colorectale ou gastrique.

- Enfin, pour le raffinement, nous ne pouvons pas nous passer d'animaux puisqu'il s'agit d'une étude sur la douleur. Les animaux seront stabulés dans une salle climatisée avec un cycle 12 : 12 durant au moins 7 jours et auront libre accès à la boisson et à la nourriture. Le régime répondra aux besoins nutritionnels des animaux. Au vu de l'objectif du protocole, aucune couverture analgésique n'est prévue lors des tests. Les animaux seront toutefois observés à chaque point de la cinétique se déroulant au maximum sur 45 minutes afin d'identifier les points limites et d'arrêter l'expérimentation si la douleur induite est trop intense. Tous les animaux seront mis à mort avant leur réveil (anesthésie terminale) ou après la fin des distensions colo-rectales chez les rats vigiles.

La mise en évidence et, si elle est présente, la compréhension des mécanismes de la sensibilisation croisée de différents segments du tube digestif permettra d'améliorer nos connaissances de la viscéro-sensibilisation et d'expliquer partiellement la fréquence des chevauchements entre TFI que l'on rencontre en clinique.

11657 La douleur est un problème de santé publique majeur qui diminue la qualité de vie des patients et son traitement constitue un impact économique considérable. Bien que des progrès importants aient été réalisés dans la compréhension des mécanismes de la douleur, peu d'avancées ont été réalisées dans le développement de nouveaux analgésiques. Les opiacés sont encore aujourd'hui les molécules les plus utilisées en clinique et ce malgré leurs nombreux effets secondaires à court et à long terme comme notamment la dépression respiratoire, la constipation, la tolérance (diminution de l'effet analgésique au cours du temps) et la dépendance. Nous avons démontré dans des travaux antérieurs que certains de ces effets indésirables sont dus à l'activation endogène des récepteurs du neuropeptide FF suite à une administration prolongée d'opiacés. Récemment, une collaboration internationale nous a permis d'identifier et de breveter un nouveau composé à dualité d'action. Ce composé est à la fois un analgésique opioïde puissant mais également un bloqueur des récepteurs du neuropeptide FF ce qui atténue fortement les effets secondaires associés à son administration chronique, en particulier la tolérance et la dépendance. Le but de ce projet est double. Il s'agira tout d'abord de comparer l'efficacité thérapeutique de ce nouveau composé avec la morphine, qui est l'analgésique le plus utilisé en clinique, et le TRV130 (olicéridine) qui est actuellement en phase III de développement clinique et qui est décrit comme présentant moins d'effets secondaires que la morphine notamment moins de dépression respiratoire. Le deuxième objectif de ce projet sera de développer des analogues de notre composé présentant une meilleure biodisponibilité. Ces analogues seront initialement caractérisés dans des essais *in vitro* et ceux présentant le profil le plus intéressant seront évalués *in vivo* afin de définir un candidat médicament pour les futurs développements. Les effets analgésiques de ces différents composés ainsi que leurs effets secondaires seront évalués chez la souris en adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer : les molécules testées *in vivo* sont caractérisées au préalable *in vitro* pour leur activité et leurs caractéristiques physicochimiques. Cependant, l'évaluation de leur effet sur la nociception ou le syndrome de sevrage n'est réalisable que sur l'animal entier. Il n'existe pas de modèles *in vitro* permettant de réaliser ce travail.

Réduire : Compte tenu de la variabilité dans les différentes expériences prévues et de nos résultats antérieurs, le nombre d'animaux est limité à 10 par groupe, ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans une animalerie dont le fonctionnement est conçu pour maximiser leur confort et limiter leur souffrance. En particulier, les animaux seront hébergés en cohorte, dans un milieu enrichi, et observés quotidiennement par l'expérimentateur ou une personne compétente. Pour chaque procédure, des points limites adaptés ont été définis selon les directives éthiques indiquées par l'association internationale pour l'étude de la douleur

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet : 352 souris

11658 Le test décrit dans ce projet concerne le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant l'exploration du système respiratoire.

Il permet d'écarter des molécules qui auraient des effets néfastes sur la santé humaine (bronchospasme), ou de garder des molécules qui pourraient faire preuve d'efficacité dans certaines pathologies (propriétés bronchodilatatrices dans le cadre du traitement de l'asthme).

La procédure utilisée dans ce projet a été caractérisé dans la littérature scientifique et sera mise en oeuvre au sein du laboratoire de pharmacologie générale.

Ce test nécessite l'utilisation de cobayes et ne peut être efficacement remplacé par des méthodes alternatives. Il est en effet difficile, voire impossible, de remplacer la complexité des régulations physiologiques observées chez l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. L'utilisation d'animaux vivants, est donc justifiée par le fait que le modèle décrit dans ce projet vise à étudier les effets de substances pharmacologiques sur la fonction respiratoire.

Particulièrement impliqué dans l'usage raisonné des animaux de laboratoire, nous mettons tout en oeuvre pour réduire leur utilisation au strict nécessaire. Aussi, le nombre d'animaux utilisé pour chaque test sera optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. La procédure décrite dans ce projet étant terminale, les animaux ne sont pas réutilisés dans d'autres études.

Le raffinement des méthodes expérimentales afin de réduire au maximum la souffrance animale est mis en oeuvre grâce à l'utilisation de points limites clairement établis (incluant une surveillance de l'aspect général, un suivi de poids...), permettant d'euthanasier tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse. Le programme d'anesthésie et d'analgésie est défini par un vétérinaire, afin de réduire au maximum toute douleur ou sensation de souffrance. De la même manière, lorsque les protocoles l'exigent, les chirurgies sont raffinées au maximum, en mettant à disposition des animaux, de l'oxygène à concentration ajustable et des tapis chauffants. Aussi, il est mis en place un enrichissement complet dans leur hébergement, sous la forme de jouets, litière, objet de nidification, objet à ronger ou mastiquer, présence de congénère.

Nous estimons que le nombre d'animaux qui sera nécessaire pour les 2 prochaines années sera de 80 cobayes. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

11659 Les différents tissus de l'organisme sont approvisionnés en sang par les artères. Plus on s'éloigne du cœur, plus le calibre de ces artères est réduit. Les petites artères périphériques, comme les artères de la peau, ont la capacité de se contracter afin de contrôler la répartition du flux sanguin dans les différents organes de l'organisme. Le niveau de contraction de ces artères ou du cœur est sous le contrôle de nerfs appartenant au système nerveux sympathique. Ce système est impliqué dans toutes les réactions d'adaptation à l'environnement et à la réponse au stress non consciente (accélération du rythme cardiaque, battement cardiaque sans qu'on « commande » à son cerveau de le faire etc.).

Notre but est d'étudier le rôle de l'innervation sympathiques sur les artères périphériques de petit calibre, de gros calibres et du cœur. Pour cela, nous avons généré 2 modèles de souris génétiquement inactivées spécifiquement dans les neurones sympathiques pour 2 récepteurs qui ont un effet inverse : 1) un modèle de souris transgénique qui permet une fois le récepteur inactivé d'obtenir une plus grande densité de nerfs (hyper-innervation) autour des artères et dans le cœur et 2) un modèle qui à l'inverse permet une diminution de la densité de nerfs (hypo-innervation) à la

fois autour de l'aorte et également au niveau du cœur. Ces modèles vont permettre pour la première fois de réellement déterminer le rôle de cette innervation, physiologiquement, et lors de processus d'adaptation comme ici le changement de régime alimentaire.

L'espèce animale utilisée est la souris. Nous avons choisi ce modèle car il présente un bon compromis entre la proximité physiologique avec l'Homme et la facilité de manipulation génétique. Néanmoins lors de nos échographies doppler, ces souris ne présentent pas de variations de leurs paramètres cardiaques fonctionnels à l'état basal (fraction d'éjection, rythme cardiaque, fraction de raccourcissement, flux aortique.). Ceci est attendu car le système nerveux sympathique qui est hypo ou hyper-innervé dans nos modèles n'est actif que dans des situations d'adaptation à l'environnement (challenge, stress...).

Chez l'Homme une alimentation « trop salée » peut provoquer une hypertension artérielle. Afin d'étudier le rôle de l'innervation sympathique au niveau cardiovasculaire dans des conditions d'une hypertension artérielle qui est un phénomène stimulant ce système sympathique, nous donnerons à ces souris hypo- ou hyper-innervées un régime en haut teneur en sel.

Le nombre d'animaux total requis pour ce projet est de 240 (minimum nécessaire pour obtenir un résultat scientifique valide et Statistique). Ce projet respecte les principes énoncés par la règle des 3R et un maximum d'expérimentations *in vitro* a été réalisées avant de passer à l'expérimentation sur le recours incontournable à l'expérimentation animale (ce projet visant à étudier l'effet de la suppression *in vivo* de 2 protéines, il n'est pas possible de s'en affranchir). Nos souris sont hébergées en groupe dans un milieu enrichi en coton de nidification ; toutes les précautions sont prises afin d'assurer au mieux le bien-être des animaux en réduisant au minimum leur stress lors des manipulations. Des critères d'arrêt précoce ont été prévus pour exclure de la procédure tout animal présentant des signes cliniques de douleur de stress.

Cette étude de la mise en place et le maintien de l'innervation sympathique des vaisseaux et du cœur permettra de mieux comprendre l'étiologie de certaines affections ainsi que leurs conséquences (hypertension artérielle en particulier, ischémie diabétique, infarctus du myocarde, cardiomyopathies dilatées, insuffisance cardiaque.), et ainsi de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques.

11660 La maladie de Parkinson (MP) se situe au second rang des maladies neurodégénératives les plus communes. Elle se caractérise par la dégénérescence des neurones de la substance noire, qui se projettent au striatum et sécrètent de la dopamine. Ces structures font partie des ganglions de la base, un ensemble de noyaux dans le cerveau responsable de la mémoire motrice. En effet, les symptômes majeurs de la MP incluent des troubles moteurs comme la lenteur à initier les mouvements (akinésie), la rigidité musculaire ou encore le tremblement de repos.

Nos études expérimentales récentes ont montré l'existence chez la souris d'une nouvelle sous population d'interneurones cholinergiques (ACh+) du striatum, les interneurones ACh+/Lhx6+, qui dysfonctionnent dans un modèle de la MP.

Notre objectif est de déterminer la fonction de cette nouvelle sous population d'interneurones cholinergiques dans le comportement moteur en condition saine et dans la MP. Nous allons chercher d'éventuelles modifications de comportement pendant l'exécution de tâches motrices et lors de manipulations (stimulation ou inhibition) spécifiques des interneurones d'intérêt chez des souris adultes saines et modèles de la MP. Ce projet utilisera 395 souris adultes.

Pour manipuler spécifiquement l'activité des interneurones ACh+/Lhx6+, des molécules photo-stimulables (rassemblées dans un vecteur viral) seront exprimées dans les interneurones ACh+/Lhx6+ chez des souris transgéniques (souris Cre/Flp). Puis une source de lumière (un laser dans notre cas) sera appliquée dans le striatum. Pour injecter bilatéralement les molécules photo-stimulables dans le striatum nous ferons une chirurgie qui requiert une micro-perforation du crâne et de la dure-mère pour accéder à la structure cible, puis une micro-injection du vecteur viral via une aiguille fine dans chaque hémisphère. Pour créer le modèle souris de la MP nous ferons une micro-injection unilatérale de la toxine 6-hydroxydopamine (6-OHDA) dans un striatum lors de la même chirurgie. Finalement, toujours dans la même chirurgie et dans la même structure, une fibre

optique sera implantée bilatéralement et chroniquement. Ceci permet d'illuminer bilatéralement le striatum de la souris avec un faisceau laser, et ainsi de manipuler l'activité des interneurons d'intérêt pendant les expériences de comportement.

Après récupération post-opératoire, les souris seront entraînées et testées dans des tâches motrices adaptées à leur espèce. Pour cela les animaux sont laissés libres dans le dispositif où les tests comportementaux se déroulent. Afin d'illuminer une partie du striatum, les fibres optiques implantées dans le cerveau de l'animal sont connectées au faisceau laser avant le début de l'expérience de comportement. Cette connexion est réalisée en quelques secondes et est totalement indolore pour les souris.

L'ensemble des données obtenues fournira des indices importants quant à la fonction motrice *in vivo* des interneurons ACh+/Lhx6+ du striatum en conditions saine et pathologique.

Concernant l'application des 3Rs, le laboratoire a déjà mené des études *in vitro* et a démontré la possible implication des interneurons ACh+/Lhx6+ dans les symptômes moteurs de la MP, cependant il reste à confirmer ces résultats *in vivo*. Nous analyserons nos données au fur et à mesure des expériences, pour éviter des expériences inutiles et les mêmes animaux seront testés pour différentes conditions afin d'en minimiser le nombre. Les animaux seront hébergés dans des cages standards enrichies (ex. tunnels), et dans un environnement contrôlé avec accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Avant toute chirurgie ou manipulation douloureuse, une combinaison d'anesthésique et sédatif sera administrée, ainsi qu'un analgésique. En post-opératoire, les souris auront au moins une semaine pour se rétablir. Pendant la chirurgie et tout au long des expériences, leurs paramètres comportementaux et physiologiques seront observés attentivement. Finalement, pour soulager le stress pendant les expériences, les animaux seront d'abord familiarisés avec l'expérimentateur et habitués à la salle de comportement.

11661 Le cerveau est constitué de neurones ainsi que d'un autre type cellulaire au moins aussi abondant appelé astrocytes. Alors que le rôle des neurones dans le fonctionnement cérébral est largement reconnu et étudié, le rôle des astrocytes et leurs interactions avec les neurones reste très largement méconnu. Néanmoins, les données récentes suggèrent qu'ils seraient aussi impliqués dans le contrôle des états comportementaux et des fonctions cognitives. Le but de ce projet est précisément d'étudier les relations neurones-astrocytes dans une structure particulière, le colliculus supérieur.

Le colliculus supérieur est une structure sous-corticale fondamentale dont le but est de diriger les récepteurs sensoriels de la tête vers des objets d'intérêt. Chez la souris, certains neurones du colliculus répondent à un stimulus visuel, et l'information motrice qui en sortira aura pour but de diriger le regard en orientant la tête. Le rôle des astrocytes dans ce comportement sera étudié en caractérisant leurs propriétés anatomiques et fonctionnelles dans les couches visuelles du colliculus supérieur et en analysant comment ils interagissent avec les neurones.

Ce projet de recherche fondamentale s'étalera sur 5 ans et utilisera 311 souris. Son but final étant d'étudier les interactions neurones-astrocytes dans des aspects comportementaux, il n'est pas possible remplacer les enregistrements du cerveau intact par des simulations ou par des cultures de cellules du cerveau. Néanmoins, dans le but de réduire le nombre d'animaux nécessaires à ce projet, certains animaux seront utilisés pour plusieurs expériences et les techniques de stimulation seront optimisées pour enregistrer différents paramètres chez le même animal. De plus, nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes par l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques et veillerons au bien-être des animaux, en particulier après les procédures chirurgicales, afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie.

11662 Notre groupe de recherche est orienté vers l'étude de la physiopathologie des troubles du spectre de l'autisme (TSA) plus particulièrement sur les connexions synaptiques et les réseaux neuronaux impliqués.

Les chambres microfluidiques consistent en une compartimentation de deux populations distinctes de neurones pour faciliter la visualisation des synapses entre elles. En effet, *in vitro* ces chambres

permettent de diriger la formation des synapses dans des dizaines de rangées parallèles reliant les deux populations neuronales. Cette technique offre la possibilité de manipuler pharmacologiquement et génétiquement les deux populations neuronales de façon indépendante. Elle permet également un contrôle spatiotemporel du microenvironnement neuronal.

Le développement de cette technique de chambres microfluidiques nous permettra de reconstituer et de voir évoluer au fil du développement un réseau cortico-striatal *in vitro*. En effet, nous allons cultiver les neurones dans deux chambres reliées par un canal permettant aux neurones d'un côté de connecter l'autre chambre. Cette connexion via le canal permet donc la création d'une synapse. Cette technique va nous permettre plus particulièrement d'étudier et de mieux comprendre les mécanismes évolutifs cellulaires des TSA et de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.

Cette technologie permettra d'étudier entre autres de nombreux phénomènes tels que la dynamique pré-synaptique, la morphologie et la transmission synaptique et la signalisation post-synaptique. Par exemple cette technique a été développée dans le cadre de la maladie de Huntington et a permis de montrer que le statut génétique du compartiment pré-synaptique, c'est-à-dire les neurones corticaux, est nécessaire et suffisant pour altérer ou restaurer le circuit cortico-striatal. Et ainsi mettant en évidence un rôle crucial du compartiment cortical dans la génération des symptômes striataux dans cette pathologie.

L'objectif du projet est le développement de la technique de chambre microfluidique à partir de culture primaire de neurones du cortex et du striatum issu de cerveaux de fœtus de rats (développement embryonnaire de 15 jours, E15) dans un premier temps et par la suite de souris (développement embryonnaire de 14.5 jours, E14.5). Le modèle rat est utilisé dans notre laboratoire et de plus, nous souhaitons par la suite pouvoir utiliser des lignées transgéniques de souris modèle de pathologie. L'utilisation des embryons de cet âge-là permet à la fois de disposer de neurones différenciés, sains et fonctionnels (contrairement à la plupart des lignées neuronales disponibles).

La mise au point des cultures primaires de neurones striataux et corticaux sera réalisée dans un premier temps à partir de femelles gestantes contrôles. Une fois la technique développée et maîtrisée les cultures primaires seront réalisées à partir d'animaux présentant des TSAs (modèles environnementaux et génétiques) pour lesquels nous soumettrons une autre demande APAFIS.

De plus le développement de cette technique pourra dans un deuxième temps être étendu à d'autres pathologies psychiatriques et neurologiques.

Afin d'être en conformité aux règles 3R :

- Remplacer : L'étude des connexions synaptiques ne peut pas être réalisée uniquement sur des lignées cellulaires établies en raison de leur éloignement de la réalité physiologique et de leur homogénéité. En effet un seul type cellulaire est représenté dans des lignées alors que les neurones prélevés dans le cortex et le striatum possèdent des caractéristiques différentes (expression de récepteurs, de protéines et morphologie). Elle requiert donc l'utilisation de cellules primaires, obtenues directement à partir de prélèvements biologiques, ayant une morphologie, un comportement et une activité très proches de ce qui se passe *in vivo*. De plus, il a été montré que les neurones primaires sont plus similaires au microenvironnement *in vivo* que les lignées cellulaires.

- Réduire : La mise en place de cette nouvelle technique nécessite 300 embryons de rat (soit 50 rattes gestantes) et 600 embryons de souris (soit 100 souris gestantes), soit un total de 1050 animaux. Nous récupérerons de chaque embryon le striatum et le cortex afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. De plus la miniaturisation du système nous permettra de limiter fortement le nombre de cellules en culture et donc d'animaux.

- Raffiner : Les femelles gestantes seront hébergées dans des cages contenant du matériel d'enrichissement environnemental (matériel de nidification) pour assurer leur bien-être.

11663 La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique la plus répandue avec une naissance masculine sur 3500. Elle atteint l'ensemble des muscles de l'organisme avec comme conséquence la plus grave l'atteinte de la fonction des muscles de la respiration. Ces muscles

servent à mobiliser le poumon, permettant, telle une pompe, d'inspirer et d'expirer. Quand cette pompe est trop atteinte nous devons la suppléer grâce à la ventilation mécanique. Grâce au progrès de cette prise en charge, le pronostic vital des patients s'est considérablement amélioré. Cette prise en charge peut encore être améliorée.

En effet, depuis peu a été mis en évidence chez des sujets non atteints de maladie génétique musculaire la présence d'effets délétères de cette ventilation mécanique sur la fonction contractile des muscles respiratoires

Dans notre démarche scientifique, centrée sur le modèle murin de la DMD, la souris mdx, nous voulons objectiver et mieux caractériser les effets délétères potentiels de la ventilation mécanique sur le diaphragme des souris porteuses de l'anomalie génétique caractéristique de la DMD chez l'homme. Par cette étude nous voulons mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de limiter les effets délétères de la ventilation mécanique dans la myopathie de Duchenne.

En effet, pour cette maladie musculaire il n'existe aucun médicament. Afin de trouver le traitement le plus efficace pour limiter les effets secondaires néfastes de la ventilation mécanique, nous étudierons les conséquences de celle-ci à court et long terme. Nous pourrions ainsi tester 2 molécules pharmacologiques ciblant la perturbation des flux de calcium dans la cellule et la production de stress oxydant, qui sont deux mécanismes impliqués dans l'aggravation de la fonction musculaire dans la DMD et potentiellement stimulés par la ventilation mécanique. Le nombre estimé d'animaux utilisés sur 5 ans sera de 280.

Nous respecterons le principe des 3 R. Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous avons organisé nos expériences aux mieux pour Réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données. Nous avons raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux, et pour apprécier au mieux les points limites.

11664 L'utilisation de la partie extérieure (parcours) par les poulets en élevage plein air est très variable et souvent faible. Les caractéristiques individuelles définissant le tempérament de l'animal pourraient partiellement expliquer l'utilisation ou la non-utilisation de ce parcours. De plus il est connu que les différents profils de tempérament ont un impact sur les capacités cognitives (mémoire et apprentissage, par exemple) des individus et par conséquent sur la manière dont les individus vont interagir avec leur environnement.

Notre projet vise donc à caractériser davantage, au niveau comportemental et cognitif, les différences existantes au sein d'un même lot de poulets plein-air. En particulier, nous examinerons l'impact du niveau d'exploration du parcours sur l'ensemble des comportements, la motivation et les différents processus cognitifs (mémoire, apprentissage, inhibition comportementale, persistance) des individus (400 individus repartis en 2 lots de 200 poulets mâles).

Ce projet est en adéquation avec les exigences de réglementation et éthique relatives à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques.

Remplacement : Le recours aux animaux entiers dans les études de comportement et cognition animale reste nécessaire, afin d'avoir une vision sur la complexité des individus face aux contraintes environnementales et sociales auxquelles ils sont soumis. Il est également important de se placer en condition d'élevage pour pouvoir suivre le comportement naturel d'exploration des animaux sur les parcours extérieurs.

Réduction : 400 individus repartis en 2 lots de 200 poulets mâles seront requis pour simuler les conditions des élevages commerciales. Afin de limiter le nombre de variables et conséquemment le nombre d'animaux nécessaires pour les tests statistiques, nos expériences seront réalisées uniquement sur des poulets mâles. Comme plusieurs manipulations sont prévues en parallèle, il est important d'avoir deux groupes suffisamment représentatifs pour étudier le comportement exploratoire général du lot et pouvoir identifier des individus avec des comportements explorateurs extrêmes (les plus et les moins explorateurs). Le lot L1 sera utilisé pour étudier plus en détails le comportement, les interactions sociales et la motivation des poulets, alors que le lot L2 servira à

étudier les aspects cognitifs. Le design expérimental et les statistiques utilisés (analyse en composantes principales, modèles linéaires, ANOVA) sont en accord avec la littérature existante pour l'étude de la personnalité et cognition animale et nous permettront de tester un grand nombre d'individus tout en simulant ce qui pourrait se passer dans un élevage traditionnel.

Raffinement : Des stratégies de raffinement ont été mises en place pendant tout le procès expérimental. Les conditions d'élevage des animaux se rapprochent de celles d'un élevage avicole biologique classique conformément à la réglementation sur l'agriculture biologique. Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales d'alimentation et des soins, avec un suivi quotidien afin d'assurer leur bien-être. Des points limites ont été déterminés et une surveillance au minimum quotidienne des animaux est assurée afin de détecter précocement toute altération de leur état de santé ou de leur comportement.

11665 Les allergies sont très répandues au sein de notre société et ont été classées comme la quatrième pathologie en termes de morbidité par l'OMS. La prévalence des allergies est en constante augmentation, que ce soit dans les pays développés ou non. Elles constituent ainsi un vrai problème de santé publique. Coûteuses, les allergies altèrent aussi la qualité de vie des patients. Par ailleurs, l'allergie alimentaire, très courantes peut évoluer vers des manifestations respiratoires plus graves à l'âge adulte, c'est ce qu'on appelle la marche atopique. Des lacunes existent sur les mécanismes de la progression de l'allergie et de son évolution.

L'objectif de ce projet est de déterminer quels facteurs sont impliqués dans l'initiation et l'orientation de la réponse immune au cours de l'asthme allergique, il est crucial de comprendre le rôle de la voie de sensibilisation entraînant une perturbation de l'intégrité de la barrière et de son microenvironnement dans l'initiation et l'orientation de la réponse immune au cours de l'asthme allergique.

Ce travail nous permettra de développer notre connaissance des mécanismes immunologiques impliqués dans l'allergie et d'améliorer la prise en charge des patients. La recherche dans ce domaine implique l'utilisation de modèles animaux d'allergie alimentaire et respiratoire.

Ainsi l'utilisation de souris est nécessaire pour étudier de façon optimale la réaction *in vivo*. Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué de façon à réduire, remplacer ou perfectionner l'utilisation de l'expérimentation animale. Il est impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire et les barrières biologiques uniquement par des études *in vitro*.

Dans l'allergie, de nombreuses cellules immunitaires sont impliquées, telles que les lymphocytes ou les cellules épithéliales et leurs interactions ont un rôle fondamental dans le développement de la maladie. De plus, l'allergie est caractérisée par le déclenchement de symptômes, uniquement l'expérimentation animale est un élément essentiel de ce projet afin de modéliser efficacement la réponse physiologique globale du système. Cependant, chaque fois que possible, les études sur les animaux seront réduites grâce à l'utilisation de modèles *in vitro*. Le modèle animal utilisé a été soigneusement conçu et évalué pour fournir des informations pertinentes pour une application future à l'homme. Ce modèle est bien établi et possède l'avantage de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés du fait de la connaissance et de la précision des paramètres étudiés. Enfin, seul le personnel qualifié et expérimenté participera à l'expérimentation animale. Ces exigences visent à s'assurer que les expériences seront effectuées efficacement et afin de minimiser la souffrance de l'animal.

Le nombre de souris sera au nombre de 352 pour la totalité du projet. Afin de limiter le stress, l'environnement d'élevage sera enrichi avec des bouts de papier sans cellulose. Des mesures seront prises afin d'améliorer les conditions expérimentales envers l'animal, notamment l'utilisation d'analgésique pour diminuer la douleur avant l'injection de l'euthanasiant. De l'aspirine® diluée dans l'eau de boisson sera utilisée comme analgésique. Les procédures pouvant être douloureuse seront réalisées sous anesthésie à la Kétamine-Xylazine et les souris sont placées dans une cage sans litière sur tapis chauffant afin de les protéger d'une hypothermie, la température sera suivie au cours de l'expérimentation. Le réveil est effectué dans une salle isolée, sur tapis chauffant. Le réflexe de

retrait de la patte arrière sera testé pour évaluer l'intégralité de l'anesthésie physique de l'animal. Une goutte de crème ophtalmique sera appliquée pour protéger les yeux des souris pendant l'anesthésie.

11666 Cette demande d'autorisation concerne la réalisation d'essais de toxicité aiguë sur poissons pour répondre à des exigences réglementaires. Les données générées, à partir de ces essais, sont essentiellement utilisées pour évaluer le danger pour l'environnement des substances chimiques et établir le classement correspondant. Les valeurs obtenues peuvent également servir de données d'entrée pour la démarche d'évaluation des risques liés à l'utilisation de ces substances chimiques. La mise en œuvre de ces essais dépend à la fois des informations mises à disposition de l'établissement utilisateur par le donneur d'ordre et également de l'objectif spécifique de réalisation. Dans le cadre de l'enregistrement de substances chimiques selon le règlement REACH (Enregistrement, Evaluation, Autorisation et Restriction des Produits Chimiques), la stratégie expérimentale qui est proposée est conforme aux recommandations de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques), reprises par l'ECHA (Agence Européenne des Produits Chimiques), pour limiter le nombre de poissons nécessaires et ainsi satisfaire aux critères de réduction et de raffinement selon la règle des 3Rs. Ainsi, l'essai de toxicité aiguë sur poissons ne sera mis en œuvre qu'après avoir déterminé les valeurs de CE50 (concentration efficace médiane) sur les organismes des deux autres niveaux trophiques : algues et daphnies (raffinement). Un essai limite sera effectué, en premier lieu, à la valeur de CE50 la plus faible obtenue pour ces deux espèces ; la réalisation d'un essai complet n'étant nécessaire que si des effets létaux sont observés (réduction).

Si les essais sont réalisés avec un objectif d'acquisition de données pour l'évaluation du danger des substances chimiques sur ce niveau trophique, un essai préliminaire et un essai complet seront réalisés. La vérification de la disponibilité de données bibliographiques acceptables dans un cadre réglementaire sur la substance soumise à essai sera effectuée au préalable de la réalisation de l'essai (remplacement). Si ces données étaient insuffisantes (disponibilité ou qualité), il n'existe pas d'alternative à la réalisation de tests sur animaux.

Dans le cadre du raffinement, le lot de *Danio rerio* est maintenu en stabulation pendant une période d'au moins 12 jours précédant l'essai : l'acclimatation-adaptation est effectuée dans les conditions environnementales contrôlées et dans une eau identique au milieu d'essai. Si le lot de *Danio rerio* est maintenu en stabulation sur une plus longue période, les poissons sont placés dans un bac recevant en continu un mélange d'eau produite à l'animalerie, correspondant à un mélange de 50% d'eau osmosée et 50% d'eau filtrée (conductivité : 300 – 350 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Cette dureté d'eau s'est avérée satisfaisante pour l'élevage, la stabulation et la reproduction de *Danio rerio* depuis la mise en place de l'installation (2002). Les autres conditions environnementales restent inchangées. Le nombre de poissons nécessaire à chaque essai est initialement stabulé à raison d'une charge biologique inférieure ou égale à 1g/L. Les poissons sont nourris quotidiennement en partie avec des artémies vivantes, leur permettant ainsi d'enrichir l'éventail de leurs comportements sociaux par le comportement de chasse. L'apport de nourriture est stoppé 24 heures avant le lancement de l'essai. Les poissons zèbres sont hébergés en groupes d'au moins 8 poissons afin d'éviter les comportements d'anxiété engendrés par l'isolement, dans des environnements connus pour engendrer un minimum de stress.

Des posters sont disposés sur certains côtés et le fond des aquariums transparents pour créer des zones de repos et éviter que les poissons soient effrayés par la vue des humains ou des silhouettes qui passent.

Du fait du caractère répétable de ces essais, la présente demande d'autorisation s'inscrit dans un cadre générique et a pour objet de couvrir les essais de toxicité aiguë sur poissons (*Danio rerio*) qui seront réalisés pendant une période de 5 ans. La démarche mise en œuvre s'inscrit clairement dans un objectif de réduction du nombre d'animaux à utiliser. Le nombre maximal de poissons utilisé pour tester une substance est 80, se divisant ainsi : 14 si arrêt après l'essai limite et 66 supplémentaires si la réalisation d'un test complet (essais préliminaire (24 poissons) et définitif (42 poissons) s'avère

indispensable après la réalisation de l'essai limite. Sur la base du nombre d'essais réalisés sur les années précédentes, l'utilisation d'un nombre total de 2 000 poissons (correspondant à 5 essais complets par an sur 5 ans) a été estimée.

11667 Ce projet de recherche fondamentale vise à trouver des cibles thérapeutiques pour contrôler la fuite capillaire au cours des états de choc chez l'homme.

Les états de choc constituent un enjeu de santé publique. Les admissions pour états de choc représentent un tiers des admissions en réanimation (environ 20.000 patients par an), et la mortalité associée reste de l'ordre de 40% actuellement. Il existe au cours des états de choc une fuite capillaire importante (fuite de plasma au travers des vaisseaux). Cette fuite capillaire est due à une augmentation de la perméabilité des vaisseaux du fait de l'activation de l'inflammation (syndrome de réponse inflammatoire systémique : SRIS). Lorsqu'elle est généralisée, cette fuite capillaire aggrave l'insuffisance circulatoire du fait de la baisse du volume sanguin, et participe à l'apparition de lésions sur l'ensemble des organes (syndrome de défaillance multiviscérale). La modulation de la fuite capillaire s'est avérée très bénéfique dans plusieurs modèles de choc chez l'animal. Cependant, les déterminants de cette fuite capillaire au cours des états de choc restent très peu connus chez l'homme.

Dans un travail prospectif de recherche translationnelle entre un service de réanimation médicale et un laboratoire de recherche, nous avons réalisé une étude comparative du profil d'expression de gène de cellules sanguines circulantes associé au syndrome de fuite capillaire chez 19 patients atteints de SIRS au cours du choc cardiogénique. Cette étude a permis en particulier d'identifier l'amphireguline, cible d'intérêt particulier du fait de son action sur les vaisseaux sanguins. L'association entre la concentration plasmatique d'amphireguline et la fuite capillaire a été confirmée dans une cohorte de 77 patients.

Notre objectif est de fournir la preuve de concept que la modulation de l'activité de l'AMPHIREGULINE permet de diminuer la fuite capillaire et la mortalité au cours du SIRS.

Nous avons commencé cette étude par l'analyse de l'effet *in vitro* de l'AMPHIREGULINE sur la perméabilité endothéliale.

Néanmoins, cette étude ne peut être menée uniquement *in vitro* puisque l'AMPHIREGULINE régule de nombreuses voies physiologiques au cours du SIRS, comme l'inflammation (effet chémo-attracteur sur les lymphocytes T-régulateurs), régulation de la perméabilité intestinale. Notre projet nécessite par conséquent le recours à un modèle animal, qui intègre ces différentes composantes physiologiques. Nous travaillerons sur un modèle de SIRS induit chez la souris par injection de lipopolysaccharide (LPS), modèle abondamment décrit dans la littérature. Nous comparerons dans ce modèle la fuite capillaire et la mortalité de souris génétiquement modifiées, déficiente pour l'AMPHIREGULINE, avec des souris sauvages. Le modèle de fuite capillaire au LPS a pour avantage d'être un modèle simple à mettre en place, peu invasif (1 injection IP), chez des animaux monitorés avec un traitement antalgique efficace dès que nécessaire. Ce modèle *in vivo* permettra d'avancer dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques de la fuite capillaire pour in fine, traiter des malades graves. Le modèle murin de fuite capillaire au LPS entraîne un état de choc chez l'animal, possiblement générateur d'inconfort, contrebalancé en partie par l'effet analgésique du LPS. Il est prévu une surveillance active des animaux avec administration de buprénorphine (IP 0,05mg/kg) dès que nécessaire (score CEEA59 \geq 3).

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante : (1) Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. (2) Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience, en particulier après les injections de LPS afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie.

Le nombre de souris par groupe permettant de mener à bien cette étude sera de 150 souris (cf tableau 1). L'ensemble des conditions d'hébergement a été validé par la structure bien-être de l'animal, constituée au sein du centre de recherches.

11668 Les synucléinopathies sont une famille de maladies neurodégénératives comprenant la Maladie de Parkinson (MP) et l'atrophie multisystématisée. Ces maladies sont caractérisées par l'agrégation de la protéine alpha-synucléine. Dans le cas de la MP, celle-ci forme des agrégats dans les neurones. Pour l'atrophie multisystématisée, ces agrégats sont présents dans les oligodendrocytes. Cette accumulation d'alpha-synucléine induit une perte neuronale dans ces maladies. Dans la MP, on observe une perte neuronale prononcée dans les neurones dopaminergiques avec une accumulation d'alpha-synucléine dans des inclusions cytoplasmiques appelées corps de Lewy. Les mécanismes de formation des agrégats d'alpha-synucléine et de la propagation des corps de Lewy restent très peu connus. Une dérégulation de certains métaux a été observée dans la MP, notamment le zinc qui est le deuxième métal le plus présent dans le corps humain. Des études post-mortem ont permis de montrer une accumulation de zinc dans les neurones dopaminergiques des patients atteints de la MP. Ceci impliquerait donc une dérégulation du zinc dans la MP. Pour mieux comprendre son rôle, nous voulons donc étudier cette dérégulation dans un modèle de MP chez la souris. Pour cela, nous étudierons l'effet du zinc sur la progression de la MP. Puis nous étudierons une potentielle piste thérapeutique, en utilisant le clioquinol, un ionophore du zinc. En effet, le clioquinol apporte un effet protecteur sur la perte neuronale, cognitive et motrice. Nous traiterons les animaux avec du clioquinol ou du zinc pour tester l'effet de ceux-ci sur la perte neuronale.

Cette étude comportera 90 souris C57Bl6/J divisées en 9 groupes de 10 pour tester l'effet neuroprotecteur du clioquinol et d'une supplémentation en zinc dans la MP. Dans le respect du R de réduire, ce nombre de souris a été choisi pour obtenir une puissance statistique nécessaire pour évaluer l'effet protecteur de cette molécule sur la perte neuronale dans ce modèle murin. Dans le respect du R de remplacer, dans l'état actuel des connaissances, nous ne pouvons nous passer d'animaux vivants, car il n'est pas possible de mimer le développement spatiotemporel de cette maladie dans des modèles *in vitro*. Dans le respect du R de raffiner, les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, et accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances prolongées aux animaux avec des mesures de soulagement mis en place (réhydratation, réchauffement, et traitements vétérinaires si nécessaire).

11669 L'ischémie-reperfusion est un phénomène physiopathologique qui engendre des lésions d'organes majeures. L'ischémie correspond à une diminution ou une interruption du flux sanguin artériel délivré à un organe et la reperfusion correspond au rétablissement de ce flux sanguin artériel. La reperfusion de l'artère obstruée est un élément majeur du traitement mais est donc responsable d'effets secondaires indésirables et délétères pour l'organe. L'ischémie-reperfusion intestinale (ou mésentérique) aiguë chez l'homme représente l'obstruction d'une artère digestive par un caillot sanguin. Cette pathologie est associée à une mortalité importante en réanimation (58%). Afin d'améliorer nos connaissances sur la pathologie et pour définir de nouvelles cibles thérapeutiques, il est nécessaire d'en comprendre de façon plus précise les mécanismes moléculaires. Il a été montré que les cellules endothéliales (cellules qui tapissent les artères et les veines), les plaquettes (cellules participant à la formation des caillots sanguins) et les cellules de défense immunitaire (granulocytes et monocytes/macrophages) étaient grandement impliquées dans les effets délétères de l'ischémie-reperfusion. Le CD31 est un récepteur exprimé constitutivement et uniquement sur les cellules endothéliales, les plaquettes et les cellules de défense immunitaire. La liaison CD31-CD31 impliquant ces cellules permet leur pacification par inhibition mutuelle. Lors d'une "agression

inflammatoire", comme dans l'ischémie-reperfusion, le CD31 est altéré et ne peut plus se lier à un autre CD31 sur une autre cellule. La conséquence est une activation délétère et toxique de ces trois types de cellules. De nouvelles thérapies visant à rétablir la fonction de pacification du CD31 sont en cours de développement.

L'objectif de notre étude sera d'évaluer le rôle du CD31 exprimé par les cellules impliquées dans la défense immunitaire dans les effets délétères de l'ischémie-reperfusion mésentérique.

Une expérimentation *in vivo* est nécessaire pour comprendre l'ensemble des mécanismes complexes de l'ischémie-reperfusion et permettre une analyse des organes atteints. Une expérience *in vitro* ne permettra pas d'intégrer l'ensemble de l'atteinte intestinale et de l'organisme.

Dans ce but, nous avons développé des modèles de souris transgéniques qui nous permettent de supprimer simultanément l'expression du CD31 dans les cellules endothéliales, les plaquettes et les cellules de défense immunitaire ou bien sélectivement et uniquement dans les cellules de défense immunitaire.

La suppression du CD31 permettra de comprendre son rôle de façon plus précise dans les mécanismes d'ischémie-reperfusion, et de voir si son absence s'accompagne d'une augmentation des lésions des organes.

Après une anesthésie générale, le modèle d'ischémie-reperfusion mésentérique aiguë sera réalisé par un clamage sélectif de branches terminales de la principale artère digestive (artère mésentérique supérieure) pendant une heure, puis le clamage sera enlevé pour mimer la reperfusion pendant une heure supplémentaire. Trois prélèvements sanguins seront réalisés pendant la procédure. A la fin des deux heures de procédure, sous anesthésie générale, les souris seront euthanasiées. Des segments d'intestin grêle de la souris seront prélevés. Différents critères d'évaluation seront réalisés (lésions de l'intestin, hémorragie digestive, septicémie, marqueurs sanguins d'activation des cellules de défense immunitaire, altération du récepteur CD31). Au total, nous utiliserons 99 souris pour ce projet, comprenant la mise au point du modèle et l'étude scientifique.

Ce projet est construit en intégrant la préconisation des 3R : Remplacer et Raffiner les modèles d'études actuels afin de Réduire le nombre d'animaux inclus dans les protocoles expérimentaux. 1) Remplacement : ne peut pas être réalisé dans cette étude, car l'étude du récepteur CD31 dans l'ischémie reperfusion mésentérique ne peut être envisagée qu'*in vivo*. En effet, nous souhaitons étudier l'altération du tissu intestinal, qui est le mécanisme pathologique final résultant de cette maladie. Ainsi, nous utiliserons des souris transgéniques développées par le laboratoire pour déterminer l'effet du CD31 porté par les cellules impliquées dans les défenses immunitaires. 2) Raffinement : les animaux sont hébergés avec enrichissement, sans isolement ; prise en charge de la douleur per opératoire par une anesthésie générale bien conduite et euthanasie des souris à la fin de l'intervention sous anesthésie générale. Il n'y a pas de réveil de la souris. 3) Réduction : afin de limiter le nombre d'animaux à inclure, nous avons réduit le nombre de souris au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique (soit 6 lignées de souris avec 2 groupes par lignée, 7 souris nécessaires par groupe, soit 84 souris au total plus 15 souris pour la vérification des souris transgéniques sur le récepteur du CD31).

L'intérêt de ce projet expérimental original et unique est d'améliorer les connaissances scientifiques dans l'ischémie-mésentérique aiguë, responsable de 58 % de mortalité en réanimation. Nous proposons d'identifier le rôle du récepteur CD31 exprimé par les cellules de défense immunitaire comme cible thérapeutique dans cette pathologie. Cette étude est le premier pas vers l'élaboration d'un traitement spécifique de l'ischémie-mésentérique aiguë. La durée du projet est de 3ans.

11670 L'obésité est aujourd'hui un vrai problème de santé publique dans tous les pays industrialisés (2,5 millions de morts par an dans le monde). La chirurgie de l'obésité est actuellement le seul traitement permettant à la fois la perte de poids et l'amélioration des anomalies métaboliques (diabète,..) chez les patients obèses, réfractaires aux régimes et à l'activité physique. Le nombre de chirurgies de ce

type a logiquement augmenté ces dernières années avec 44 000 interventions en 2014 en les France contre 20 000 en 2010.

La technique la plus efficace à ce jour est le court-circuit gastrique (Gastric By-pass), intervention réalisée par voie chirurgicale, si possible laparoscopique. Il s'agit d'une procédure chirurgicale lourde pouvant être suivie de complications graves voire de mortalité.

Le but de ce travail est d'étudier une alternative purement endoscopique de by-pass, l'hypothèse étant d'observer les mêmes changements métaboliques qu'avec un bypass chirurgical. L'objectif principal est de proposer un modèle animal d'endoscopie dans le but d'un passage de la procédure à l'homme dans un délai de 5 ans. Les autres objectifs seront de confirmer la sécurité, la reproductibilité de cette procédure.

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

- Le modèle animal a été réservé à la validation définitive du dispositif, par des mesures *in vivo*, notamment métaboliques (le matériel utilisé ayant déjà été mis sur le marché).
- Le modèle animal de grande taille (modèle porcin) permet, dans des conditions proches de la pratique humaine, de valider ces essais avant l'utilisation chez l'homme (exigence ANSM).
- Il s'agit de procédures chirurgicales standard pour lesquelles une anesthésie et une analgésie (per et postopératoire) adaptées sont utilisées. La souffrance animale est donc réduite au maximum. Les animaux sont stabulés au maximum 5 jours en amont de ces procédures, dans un milieu enrichi comme exigé par la réglementation animale (balle, cordes, jouets non dangereux notamment du risque d'inhalation et/ou d'ingestion.).
- Le nombre d'animaux par groupe sera de 6, nombre minimum pour atteindre une significativité des variations attendues des mesures physiques et biologiques
- Le nombre total d'animaux sera de 24 (4 groupes de 6)

11671 Les flavivirus tels que le virus de la dengue et le virus Zika sont transmis par des moustiques et sont responsables d'infections pouvant avoir des conséquences graves, en particulier neurologiques, pour les personnes infectées. La sensibilité aux formes graves de ces infections dépend de nombreux facteurs, dont la composition génétique de l'individu. Nous étudions ces facteurs génétiques dans des modèles d'infection chez la souris. Certaines lignées de souris se montrent très résistantes à une infection par voie intrapéritonéale ou intraveineuse, sans développer aucun symptôme, alors que d'autres développent des symptômes neurologiques pouvant entraîner la mort et s'accompagnant de lésions cérébrales importantes.

Dans ce projet, nous allons déterminer si les différences de lésions cérébrales observées entre les lignées proviennent de différences de capacité du virus à atteindre le cerveau depuis la circulation générale (perméabilité de la barrière hématoencéphalique) ou à des différences de sensibilité propre des neurones entre lignées de souris. Pour cela, nous allons infecter les souris par voie intracrâniale pour apporter le virus directement au contact du tissu cérébral. L'état clinique des animaux sera suivi au moins une fois par jour et les animaux seront mis à mort lorsqu'apparaîtront des signes évidents d'atteinte neurologique (prostration, paralysies). Nous comparerons ces résultats avec ceux issus d'une infection par voie systémique. Ce projet comportera donc deux procédures de sévérité modérée et utilisera au maximum 480 souris sur 5 ans.

Une partie de nos travaux sur les différences de sensibilité entre lignées de souris est réalisée sur des cultures cellulaires, en particulier des cultures primaires de neurones. Toutefois l'infection du cerveau chez un individu induit des processus inflammatoires qui impliquent de multiples cellules et tissus, en particulier les cellules immunitaires circulantes. Une bonne compréhension de ces mécanismes impose donc, à certains stades, leur étude chez l'organisme entier. Le nombre d'animaux nécessaire a été établi en fonction du nombre de lignées de souris à comparer, de l'étude des deux sexes et de notre expérience sur ce modèle pour évaluer la taille nécessaire pour chaque groupe. Les méthodes d'infection et d'analyse des prélèvements sont parfaitement au point, ce qui permettra de réduire la variabilité des résultats due aux conditions expérimentales. Une fois infectées, les souris seront suivies au moins une fois par jour, davantage si nécessaire, de façon à

éviter toute souffrance inutile aux animaux. Nous aurons recours à une anesthésie générale et/ou à une anesthésie locale aux étapes nécessaires.

Ce projet permettra d'améliorer notre connaissance de l'effet des facteurs génétiques de l'hôte sur sa sensibilité aux conséquences neurologiques graves des infections par le virus Zika et le virus de la dengue.

11672 Les réactions d'allergie médicamenteuse, appelées également toxidermies médicamenteuses, sont des effets secondaires fréquents chez les patients hospitalisés (1-3%). Il s'agit de réactions de type d'hypersensibilité retardée dues à des lymphocytes T, au cours desquelles la prise de médicament est l'élément déclencheur. Ces réactions allergiques peuvent être de sévérité très variée. Les plus sévères sont connues sous le nom de nécrolyse épidermique toxique (NET). Il s'agit d'une réaction rare (2-4 patients/million d'habitants/an) mais extrêmement sévère, avec décollement et nécrose du tissu cutané, parfois sur l'ensemble du corps. Ces réactions sont potentiellement mortelles (~30%) ou entraînent fréquemment de graves séquelles (>50% des patients). Malheureusement il n'existe à ce jour aucun traitement ayant fait preuve de son efficacité dans cette pathologie, et la seule prise en charge consiste à arrêter le traitement responsable et à prendre en charge la cicatrisation des patients dans un centre de grands brûlés.

Des études réalisées chez les patients NET ont permis d'identifier un biomarqueur qui est exprimé de façon prédominante sur les cellules immunes responsables de la maladie. Ce biomarqueur constitue une cible de traitement nouvelle et prometteuse. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'activité thérapeutique d'un médicament déjà commercialisé qui cible ce récepteur, afin d'établir son intérêt potentiel pour traiter la NET. Ce médicament est prescrit à l'heure actuelle pour une autre indication clinique.

A ce titre, comme il n'existe pas de modèle animal préclinique de NET, nous avons choisi d'évaluer l'activité de ce médicament dans un modèle de substitution, de type « Graft versus Host Disease » (GVHD), qui est couramment utilisé pour tester de nouvelles approches thérapeutiques pour cette pathologie. La GVHD correspond à la maladie du greffon contre l'hôte et constitue un parfait modèle de substitution pour valider nos études, les acteurs cellulaires de cette pathologie étant les mêmes que ceux de la NET. En effet, les lésions cutanées de GVHD chez la souris présentent des similitudes histologiques avec les lésions de NET.

Des souris sans système immunitaire seront greffées avec des cellules humaines qui vont réagir contre l'hôte (GVHD) mais en conditions modérées ce qui permettra de suivre les animaux sur une durée de 6 semaines maximum. Des prélèvements sanguins réguliers seront effectués pour suivre l'implantation des cellules. De nombreuses analyses seront réalisées post mortem sur les échantillons prélevés en fin d'expérience. Le projet est découpé en 2 parties : une caractérisation des marqueurs d'intérêt lors de l'étape 1, puis l'évaluation de l'effet thérapeutique de l'anticorps d'intérêt dans ce modèle. Dans un premier temps, nous validerons que le biomarqueur d'intérêt est bien exprimé par les cellules d'intérêt au cours du développement de la réaction de GVHD. Puis, nous évaluerons l'activité thérapeutique du médicament candidat (immunoglobuline humanisée) et la comparerons à celle d'un médicament de référence (ciclosporine). Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement).

Remplacer : Des études *in vitro* ont au préalable été réalisées afin de vérifier l'effet de cette molécule thérapeutique sur des cellules exprimant la cible. Cependant, la réponse immunitaire est un phénomène biologique complexe faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation unique ce qui rend impossible une étude complète dans des tests *in vitro* (interaction avec d'autres cellules, tissus etc), c'est pour cette raison que le modèle expérimental chez la souris est indispensable et ne peut pas être remplacé avant d'envisager une application clinique.

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

d'analgésique systémique ou local avant les interventions ou durant les phases tardives des expérimentations lorsque les premiers signes cliniques sont attendus.

Réduire : le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats. Pour cela nous utiliserons 210 souris.

11673 Pour synchroniser les chaleurs et les ovulations chez la chèvre afin de réaliser une insémination artificielle, les filières d'élevage utilisent des traitements hormonaux qui comprennent une phase progestative sous la forme d'une éponge vaginale imprégnée d'un analogue (FGA) de la progestérone (P4) laissée en place une dizaine de jours. Cette imprégnation permet l'expression d'un comportement d'oestrus et la mise en place d'un cycle de durée normale après l'ovulation. Mais ces traitements à base de stéroïdes de synthèse ne sont pas utilisables en élevage biologique et sont de plus en plus contestés dans les élevages en général. Nous avons donc entamé un programme d'exploration de la présence de progestérone à l'état naturel dans un certain nombre de plantes, leur utilisation étant alors autorisée dans les élevages ci-dessus mentionnés. Nous avons mis en place des mesures sur une plante de nos campagnes potentielle candidate à utiliser pour une distribution orale.

Le programme consiste donc à mesurer (1) les concentrations plasmatiques sanguines de progestérone après distribution orale, sous forme de granulés ou de dose individuelle per os, (2) l'efficacité clinique sur le comportement d'oestrus et l'ovulation des préparations mentionnées.

Ce programme s'étalera sur 5 ans où nous serons amenés à tester 15 groupes de 6 animaux, soit un total de 90 chèvres.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacement : la complexité de la digestion ruminale et du métabolisme des stéroïdes dans l'organisme in toto ne peut pas être remplacée par des systèmes alternatifs

Réduction : le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé afin de ne pas utiliser plus d'animaux que nécessaire, tout en conservant une bonne mise en évidence statistique

Raffinement : Les animaux ovariectomisés recevront un traitement anti-douleur ; tous les animaux seront hébergés dans les conditions classiques du laboratoire, en groupe social sur paille et avec enrichissement (caisse en bois pour grimper) et le nombre de prises de sang permettra de mettre en évidence l'effet recherché.

11674 Le cancer de l'œsophage est une maladie agressive. L'incidence estimée était de 482 000 cas dans le monde en 2008, avec un taux de mortalité annuel d'environ 406 800 cas, ce qui en fait la sixième cause de mortalité liée au cancer.

Le traitement curatif des tumeurs de l'œsophage ou de la jonction gastro-œsophagienne (GEJ) passe par une combinaison entre chimiothérapie, radiothérapie et chirurgie.

Lors de l'intervention chirurgicale, une fois l'œsophage malade retiré, afin de rétablir la continuité gastro-intestinale, l'estomac est transformé en tube (tubulisé) et utilisé comme néo-œsophage. Il sera ensuite suturé au reste de l'œsophage. Malheureusement, la suture entre l'estomac et l'œsophage ne guérit pas correctement chez 30% des patients. Cela a un impact considérable sur leur qualité de vie (morbidité et mortalité élevées) et a également une influence négative sur le résultat oncologique final. La raison pour laquelle cette suture ne cicatrise pas correctement a plusieurs causes : mauvais état nutritionnel, tabagisme, chimiothérapie antérieure et radiothérapie. Néanmoins, la tubulisation de l'estomac implique la destruction de la majorité des vaisseaux gastriques, entraînant ainsi une baisse de la perfusion sanguine (ischémie) du côté gastrique de la future suture.

Le conditionnement ischémique est une stratégie efficace pour améliorer la perfusion d'un organe lors d'une ischémie. Cette technique a été largement étudiée dans d'autres spécialités médicales telles que la cardiologie, la néphrologie, la neurologie et la chirurgie plastique. Cela consiste en l'application de plusieurs cycles courts d'ischémie suivis d'une reperfusion avant l'évènement ischémique principal. Dans ce cas, on parle de préconditionnement ischémique (IP). Mais un

accident ischémique majeur, tel un infarctus du cœur, est souvent imprévisible et réaliser alors un IP dans la vie réelle est peu envisageable, le post-conditionnement ischémique (IPost) a donc été introduit. Il consiste en l'application de cycles courts d'ischémie / reperfusion sur l'organe cible après une ischémie majeure.

Un autre concept intéressant est le conditionnement ischémique à distance, qui consiste en de courts cycles de phases d'ischémie / reperfusion sur un organe différent de celui qui subit l'évènement ischémique majeur. Dans plusieurs études, le conditionnement ischémique à distance a été appliqué avec succès à un membre, ce qui est très pratique en situation réelle. Le conditionnement ischémique à distance peut être appliqué avant (préconditionnement ischémique distant ou RIP), ou après (postconditionnement ischémique distant ou RIPost) l'évènement majeur ischémique.

Ces 4 méthodes ont été largement étudiées, en cardiologie en particulier, avec des résultats prometteurs pour réduire l'extension des dommages causés par un infarctus cardiaque.

Mais les mécanismes sous-jacents de ces techniques ne sont pas entièrement compris, ils sont complexes et impliquent le niveau moléculaire.

Dans la tubulisation gastrique, certains vaisseaux sont détruits, impliquant, comme le montre un certain nombre d'études, une baisse de l'apport sanguin pour le futur site de suture. Nous émettons l'hypothèse que cela correspond à un évènement ischémique majeur. Par conséquent, les techniques d'IP, IPost, RIP et RIPost pourraient être utiles pour augmenter la perfusion et indirectement améliorer la guérison de la suture. En cas de succès, cela aurait un impact positif sur un grand nombre de patients dans le monde.

Pour valider cette hypothèse, il est nécessaire de travailler sur modèle animal afin de reproduire la complexité des phénomènes vasculaires d'ischémie reperfusion et évaluer leur effet sur l'organe opéré.

La mesure de la qualité de la perfusion sera faite en direct pendant l'opération chirurgicale avec des techniques d'imagerie de pointe, innovantes et mini-invasives : imagerie hyperspectrale, fluorescence et endomicroscopie confocale par laser.

Pour ce projet, 161 animaux (125 rats puis 36 porcs) au maximum seront testés dans le respect de la règle des 3 Rs.

Remplacement : Comme il n'existe dans la littérature aucune étude portant sur le préconditionnement et le post-conditionnement en relation avec notre question clinique sur l'estomac, des études sur organisme vivant restent nécessaires et le modèle animal ne peut à ce stade être totalement remplacé.

Le modèle rongeur est un bon modèle physiologique de la perfusion du tractus digestif supérieur, il reste néanmoins indispensable de transférer ensuite la méthode sur une espèce de grande taille, représentative de la situation clinique que le chirurgien rencontrera chez le patient.

Afin de réduire le nombre total d'animaux utilisés, les expériences seront conduites par étapes et petites séries d'animaux. Des analyses intermédiaires seront réalisées et les expériences seront arrêtées si les résultats s'avèrent significatifs (positifs ou négatifs). Le nombre de porcs utilisés sera aussi limité (contraintes zootechniques et économiques) : l'exploration des 4 techniques se fera dans une première étape chez une espèce rongeur (rat) sur laquelle seront sélectionnées les 2 techniques les plus efficaces pour améliorer la perfusion gastrique. Ces deux techniques seront ensuite testées sur un effectif de porcs réduit à son minimum pour obtenir des résultats concluants.

Raffinement : les animaux sont hébergés en groupes sociaux dans une animalerie répondant aux normes en vigueur, avec un environnement contrôlé (température, hygrométrie, luminosité) et des enrichissements adaptés aux besoins de chaque espèce. Afin d'éviter toute douleur, les animaux sont opérés sous anesthésie générale profonde, avec traitement de la douleur et monitoring cardio respiratoire, ils sont euthanasiés en fin d'intervention, sans réveil.

La surveillance, la manipulation et les soins apportés aux animaux sont assurés par une équipe pluridisciplinaire qualifiée de chirurgiens, vétérinaires et techniciens animaliers.

11675 Le cancer du sein « triple négatif » (CSTN) est le sous-type le plus agressif des néoplasies mammaires. Le traitement standard actuel débute par une chimiothérapie néoadjuvante (CTNA) suivie de l'excision chirurgicale. L'identification très précoce des patientes résistantes à la CTNA, ainsi que les mécanismes de résistance, peut permettre une réadaptation thérapeutique et améliorer le pronostic. Dans ce contexte, nous souhaitons évaluer, sur modèles précliniques, l'apoptose potentiellement induite par les chimiothérapies utilisées en situation néoadjuvante. Cette évaluation sera réalisée conjointement par l'évaluation de biomarqueurs tissulaires et l'acquisition d'imagerie moléculaire ciblant l'apoptose.

Notre choix concernant l'imagerie moléculaire, s'est portée sur une petite molécule, la ML-10 marquée au Fluor 18 (18F), dont la biocinétique n'a jamais été rapportée dans le contexte du CSTN. L'accumulation du traceur sera comparée au taux d'apoptose cellulaire mesurée par la méthode conventionnelle. Il permettra d'évaluer la capacité du nouveau radiotracer 18F-ML-10 pour imager la fraction apoptotique tumorale sur des modèles de cancer du sein humain triple négatif. Deux modèles de cancer du sein humain triple négatif (MDA-MB-468 et MDA-MB-231) seront utilisés pour l'étude du nouveau radiotracer.

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

Cette étude sera répartie en trois grandes parties :

(i) Etudes de faisabilités : mise au point et caractérisation des modèles orthotopiques des lignées MDA-MB-468 et MDA-MB-231 un total de 40 souris sera nécessaire ;

(ii) Etude thérapeutique : évaluation de la réponse thérapeutique par imagerie à l'aide de radiotracer mesurant le métabolisme glucidique et l'apoptose induites par les thérapies.

Cette évaluation se fera sur des modèles de xénogreffes de cancer du sein (MDA-MB-468 et MDA-MB-231) et des modèles orthotopiques de cancer du sein (MDA-MB-468 et MDA-MB-231) traités par chimiothérapie. Trois molécules seront évaluées : épirubicine, paclitaxel et TH-302. Pour cela un total de 180 souris sera nécessaire.

(iii) Caractérisation de l'apoptose induite. Grâce à l'étude précédente, nous pourrions déterminer le temps délai optimal suite aux traitements pour obtenir une fixation maximale du radiotracer dans notre tumeur. Nous pourrions alors comparer la fixation du radiotracer de l'apoptose à l'analyse des biomarqueurs tissulaires considérés comme méthode de référence. Pour cela un total de 120 souris sera nécessaire.

Dans le cadre de ce projet, un total de 340 souris femelles seront nécessaires. Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. En effet, le nombre d'animaux est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. Des méthodes de raffinements sont utilisées avec un souci du bien-être animal (condition d'hébergement optimisés, portoirs ventilés, enrichissement de milieux, surveillance quotidienne, anesthésie des animaux). Pour éviter au maximum l'angoisse ou la souffrance des animaux, les procédures seront effectuées sous anesthésie dès que cela sera possible. De plus, une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée en surveillant les points limites (Perte de poids, Oeil clos, diarrhée.). Toute observation d'un de ces points limites conduira à la sortie de l'animal du protocole et à son euthanasie. Cette décision sera prise par le responsable du projet. En cas de douleurs dues au développement tumoral, un traitement d'antalgiques sera réalisé (Rimadyl 5mg/kg). Cependant nous tenons à préciser que ce phénomène n'a jamais été observé par les différentes équipes ayant eu recours à ce type de modèle.

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

11676 Le sepsis est une affection médicale sérieuse caractérisée par des réponses inflammatoires systémiques dérégulées en réponse à une infection, conduisant à un dysfonctionnement d'organes, suivies d'une phase d'immunodépression responsable d'une susceptibilité accrue au

développement d'infections secondaires. Malgré une prise en charge précoce des patients (antibiotiques à large spectre, réanimation hémodynamique, etc.), le sepsis reste associé à un taux de mortalité important dans les unités de soins intensifs (20-40% des patients septiques 28 jours après le sepsis et 50-70% dans les mois suivants) essentiellement dû à l'incapacité du système immunitaire du patient immunodéprimé à répondre contre de nouvelles infections. Rétablir l'homéostasie du système immunitaire du patient septique représente donc un enjeu capital.

Le modèle animal est actuellement le seul modèle permettant d'étudier le système immunitaire et reproduisant la complexité de la dynamique du sepsis qui englobe à la fois des mécanismes hémodynamiques, biochimiques et immunologiques.

Différents modèles animaux ont été décrits pour étudier ce syndrome dont la dynamique reste encore complexe. Un modèle murin est particulièrement décrit pour reproduire le plus fidèlement possible les mécanismes biologiques observés chez l'Homme, décrits ci-dessus. Il s'agit du modèle CLP (Cecal Ligation and Puncture), basé sur la ligature et la perforation du cæcum sans obstruer l'intestin des animaux. Ce modèle combine la nécrose tissulaire et le sepsis polymicrobien mimant fidèlement les ruptures d'appendice et les diverticulites perforées rencontrées chez l'Homme. De plus, il s'agit du seul modèle dans lequel coexistent les deux phases clés du sepsis : la phase inflammatoire et la phase d'immunodépression.

De précédents travaux ont montré que le modèle murin CLP permettait l'induction de paramètres caractéristiques de l'immunodépression des cellules T tels que ceux observés chez le patient septique. Ces paramètres varient sur une période de 4 à 13 jours post-sepsis. Les cellules de la réponse immunitaire innée font également partie des cellules affectées par l'immunodépression induite par le sepsis chez l'Homme. Or, les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative ont des rôles différents, mais complémentaires, dans l'instauration de la réponse immunitaire. En effet, à la suite d'une infection, la réponse innée représente la première ligne de défense de l'organisme et précède donc la réponse adaptative. L'objectif de cette étude est donc de caractériser plus finement l'état d'immunodépression des cellules de la réponse immunitaire innée, à des temps précoces après induction du sepsis (24h à 72h). Cette étude s'inscrit dans un projet de recherche global visant à développer de nouveaux traitements de l'immunodépression induite par le sepsis ciblant à la fois les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative. Ceci permettrait aux patients de restaurer leur système immunitaire et ainsi prévenir les infections secondaires pouvant leur être fatales.

Règle des 3R : Le nombre de souris nécessaire pour ces expériences est évalué à 78. Ce nombre a été calculé comme étant nécessaire et suffisant pour pouvoir analyser statistiquement les résultats en tenant compte des études précédentes. Des groupes de souris contrôles serviront de contrôle de chirurgie et le système immunitaire des souris septiques sera comparé à celui de ces souris contrôles non-septiques.

Un suivi d'éléments physiologiques et comportementaux des animaux aura lieu deux fois par jour et tout au long de la procédure afin d'évaluer le bien-être animal et d'intervenir de manière rapide et appropriée en cas de nécessité. Des points limites adaptés au modèle CLP ont été définis et affinés grâce aux études précédentes. Les analgésiques appropriés seront utilisés tout au long de la procédure. Les cages des animaux seront placées dans une armoire chauffante tout au long de la procédure. Des aliments secs, humidifiés et de l'eau gélifiée seront déposés à différents endroits de la cage pour faciliter l'alimentation des souris.

11677 Ce projet a pour objectif de mieux comprendre le rôle de la signalisation énergétique cardiaque, plus particulièrement d'une voie de signalisation intracellulaire par une protéine kinase. Cette protéine kinase est un senseur métabolique qui s'active lorsque la cellule est en déficit énergétique et qui va contrôler les voies métaboliques pour préserver l'homéostasie énergétique tant à l'échelle cellulaire que de l'organisme entier. Elle joue un rôle primordial dans le cœur dont la fonction contractile doit assurer un débit sanguin répondant aux besoins de l'organisme dans différentes situations physiologiques (lors d'un exercice physique par exemple) et aussi pathologiques. Cette fonction contractile adaptée du cœur ne peut être assurée que si son état énergétique est préservé. En utilisant un nouveau modèle de souris transgénique inductible et spécifique aux cardiomyocytes.

Nous allons caractériser les effets associés à l'absence de cette protéine kinase spécifiquement dans le coeur, sur la fonction de l'organe lui-même (*in vivo* comme à l'échelle cellulaire) et évaluer l'impact que cela peut avoir sur l'organisme entier. Nous souhaitons notamment étudier l'aptitude des souris KO à fournir un effort physique durablement.

L'étude phénotypique de ce nouveau modèle transgénique, non encore caractérisé à ce jour, comporte des mesures *in vivo* (échocardiographie, activité locomotrice spontanée, aptitude physique à l'exercice, prise alimentaire, activité métabolique), ainsi que des mesures *in vitro* sur cardiomyocytes isolés, mitochondries isolées de cœur, tissu cardiaque et squelettique, visant à étudier l'ultrastructure des cardiomyocytes, la fonction respiratoire mitochondriale, l'état énergétique cardiaque et des muscles squelettiques et le niveau de stress oxydant du cœur.

Jusqu'à présent le rôle de cette protéine a été étudié dans différents types de cellules mais peu d'études portent sur sa fonction dans les cardiomyocytes. Il est important de souligner que nous sommes le premier laboratoire à examiner de telles souris et de plus par autant d'approches différentes.

Cette étude phénotypique se veut la plus complète possible, ce qui explique que le nombre d'animaux impliqués dans le projet soit assez élevé (888 au total).

Toutefois l'expérimentation a été planifiée en respectant la règle des 3R : 1-Réduire : L'utilisation de méthodes non invasives permettra un suivi *in vivo* sur une année des animaux. Cette étude longitudinale fournira un maximum de données à partir du même groupe de souris. De plus, le nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour chacune des 6 procédures du projet a été déterminé sur la base d'études publiées, de notre expérience dans le domaine et du calcul de puissance statistique afin de pouvoir valider nos hypothèses. L'exploitation maximale du matériel biologique est également prévue dans l'étude (différents organes seront prélevés, différents dosages réalisés). Enfin, le schéma des groupes expérimentaux permet de reproduire et d'utiliser des animaux de la manière la plus avantageuse possible. 2-Raffiner : Les choix concernant le modèle et les procédures ont été faits conformément à l'état actuel des connaissances et exigences envers ce type d'étude, en veillant au maximum au bien-être des animaux au cours de l'hébergement et des différents protocoles d'étude. 3-Remplacer : L'étude des caractéristiques au niveau cardiaque et de l'organisme entier d'un tel KO ne peut être réalisée que sur le modèle animal.

11678 La protéine sur laquelle nous travaillons limite la croissance tumorale. En partenariat avec une équipe de chimistes, nous avons développé une petite molécule capable d'activer notre protéine d'intérêt. Dans des précédents projets, nous avons montré que notre composé présentait des activités anti-tumorales et qu'il permettait d'induire une régression tumorale lorsqu'il était associé avec des immunothérapies utilisées actuellement pour traiter le cancer. Dans ce projet, nous souhaitons associer notre composé aux immunothérapies dans des modèles de souris récapitulant l'histoire physiopathologique du cancer du poumon. Nous avons choisi deux modèles présentant une mutation sur le gène KRAS. Aucun traitement n'est actuellement efficace sur les patients atteints de cancer pulmonaire présentant une mutation du gène KRAS. Notre objectif est de poursuivre le développement de notre composé pour pouvoir, à plus long terme, envisager son utilisation pour traiter les patients.

Nous utiliserons deux modèles de souris présentant des mutations sur la protéine KRAS qui, lorsqu'elle est mutée, favorise le développement des cancers du poumon chez l'homme. Les deux modèles de souris présentent un système immunitaire fonctionnel. A l'état normal, les souris ne développent pas de tumeurs, il est nécessaire d'induire la mutation pour provoquer le cancer. Nous attendons donc que les souris atteignent l'âge adulte pour induire le cancer dans ces animaux avant de les traiter avec notre molécule. Le comportement des animaux sera suivi quotidiennement et leur poids sera évalué deux fois par semaine de façon à assurer une bonne gestion de la douleur, le tout en accord avec les objectifs de notre étude. L'ensemble de cette étude a été conçue pour respecter la règle des 3R.

REDUCTION : Une étude exhaustive de la littérature a été menée avant d'initier ce projet afin de ne pas reproduire des expériences déjà publiées. Le nombre d'animaux utilisé lors des expériences

a été calculé pour utiliser le minimum d'animaux tout en obtenant des résultats statistiquement significatifs. Nos précédents résultats *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'absence de toxicité de notre composé sur les animaux. RAFFINEMENT : Les procédures expérimentales peuvent engendrer une douleur, pour limiter cette douleur, nous avons établi une grille d'observation visant à définir les points limites à partir desquels l'expérience sera arrêtée et qui indiquent les mesures que nous prendrons à l'apparition des premiers signes de la douleur. Toutes ces mesures seront prises pour limiter au maximum la souffrance des animaux tout au long de l'expérimentation. REMPLACEMENT : Seuls les modèles animaux permettent de tester la collaboration qui existe entre les différents compartiments cellulaires, en particulier les relations complexes entre le système immunitaire et les tumeurs. Ainsi la faisabilité et l'efficacité d'une nouvelle approche à visée thérapeutique ne peut se faire que chez l'animal. Dans ce cadre la souris est utilisée. Nous testerons 2 combinaisons thérapeutiques sur deux modèles tumoraux. Pour cela nous aurons besoin au maximum de 192 animaux.

11679 Environ 40% des cancers du côlon présentent des mutations du gène KRAS. Ces mutations sont responsables de l'activation de cet oncogène et sont à l'origine de la résistance aux immunothérapies par les anticorps thérapeutiques tel que le Cetuximab. Ainsi, il est nécessaire de développer des alternatives thérapeutiques pour ces patients non répondeurs. Des études antérieures ont identifié les gènes qui sont les marqueurs des carcinomes « KRAS dépendantes » dont le ciblage induirait la mort spécifique de ces cellules cancéreuses. Un de ces marqueurs est une enzyme nommée Syk.

Notre projet de recherche vise à étudier le rôle de Syk dans le cancer colorectal. Nos études préliminaires sur des tumeurs primaires de colon en comparaison avec le tissu sain ont montré que Syk est surexprimée dans 50% des tumeurs colorectales humaines, suggérant qu'elle contribue à l'initiation ou à la progression des tumeurs.

Nous avons étudié le rôle de Syk dans des modèles cellulaires de cancer colorectal humain présentant des mutations KRAS. Nos résultats ont montré le rôle important de Syk dans la prolifération et la viabilité des cellules, et son implication dans la résistance aux immunothérapies.

Lors de nos travaux antérieurs, nous avons isolé un candidat médicament nommé C-13, qui est un inhibiteur de Syk. Nous avons évalué l'effet de C-13 sur les lignées de cancer colorectal. Nos résultats indiquent que C-13 inhibe la prolifération et induit la mort cellulaire. De plus, le composé C-13 sensibilise les cellules aux immunothérapies, suggérant qu'en ciblant Syk on devrait améliorer la réponse au traitement chez les personnes résistantes.

A ce stade du projet, il serait important de confirmer nos résultats dans des modèles de souris. Pour cela, nous serons amenés à utiliser des souris immuno-déprimées qui « acceptent » des xénogreffes.

Dans le but d'appliquer la règle des 3Rs : Réduction : seuls ne sont injectées aux souris que les lignées cellulaires qui montrent un intérêt important pour la confirmation du rôle de la cible étudiée (tyrosine kinase Syk) dans le cancer colorectal. Une seule dose de chacune des drogues Cetuximab et C-13 sera utilisée en administration intrapéritonéale ou orale afin de limiter les doses au maximum. Raffinement : Les conditions d'expérimentation font l'objet d'un travail de raffinement continu dans le but d'améliorer les conditions d'élevage associé à une procédure de suivi du bien-être animal adaptées aux expériences, incluant les mesures mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales (anesthésie, analgésie). Les animaux font l'objet d'une surveillance quotidienne et leur milieu est enrichi à l'aide de litière mélangée à des copeaux, ainsi que de briques de peuplier. Remplacement : à ce jour aucune méthode alternative n'est disponible pour confirmer le rôle d'une cible dont les études *in vitro* ont été réalisées grâce à une approche par shRNA.

Au total, sur les 5 ans du projet, le nombre maximal de souris utilisées sera de 609 souris.

11680 L'augmentation de l'âge de la population entraîne une augmentation du nombre de cancers, et parmi eux, le cancer du sein triple négatif. Ce cancer évolue fréquemment vers l'apparition de

métastases cérébrales. En raison de leur pronostic très sombre et d'une issue rapidement fatale, ces tumeurs cérébrales secondaires constituent aujourd'hui l'un des plus gros défis en oncologie. Du point de vue du diagnostic précoce de ces micro- et macro- tumeurs cérébrales, la sensibilité et la spécificité des outils de diagnostic constituent un obstacle. L'imagerie moléculaire, comme l'imagerie par Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une technique de référence pour le diagnostic de nombreuses maladies en particulier oncologiques mais qui reste limitée dans la recherche de localisations cérébrales, compte tenu des radiotraceurs disponibles commercialement. Afin de valider le développement de nouveaux traceurs pour le diagnostic de métastases cérébrales de cancer du sein par imagerie TEP, nous devons mettre en place des modèles *in vivo* de métastases cérébrales. Nous proposons de mettre en place deux modèles sur des rat femelles nude : rats xénotransplantés en intracérébral par des cellules de cancer du sein ou après injection intra carotidienne afin de proposer un modèle métastatique plus relevant. Des nouveaux radiotraceurs ont été synthétisés. La cytotoxicité, l'affinité moléculaire et l'incorporation intracellulaire de ces nouveaux traceurs a été évalué *in vitro* sur une lignée de cancer du sein (REPLACEMENT). Afin de valider la pertinence de ces nouveaux traceurs, nous devons maintenant évaluer la stratégie *in vivo*. Le REPLACEMENT des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible dans notre contexte : l'utilité même d'un radiotraceur est de permettre un suivi *in vivo*. Dans ce cadre, la mise en place de modèles de métastases cérébrales sera réalisée sur 30 rats femelles nude. La validation des modèles de métastases sera évaluée dans un premier temps par un suivi longitudinal par une méthode d'imagerie non invasive (IRM) permettant de réaliser les examens dans le temps sur un même animal et ainsi de réduire le nombre d'animaux (REDUCTION). Lorsque les tumeurs auront atteint un volume cible, l'imagerie TEP sera réalisée. Le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les rats seront anesthésiés dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur, imagerie) et mis à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (RAFFINEMENT) : apparition d'altérations fonctionnelles, perte de poids de plus de 20% par rapport au poids avant greffes s'étalant sur plus de trois jours consécutifs, altération de l'aspect général de l'animal ou de son comportement, tumeur supérieur à 5 mm de diamètre. La durée de l'étude ne dépassera pas 10 semaines. La comparaison des courbes de survie de Kaplan-Meier de chaque série sera analysé grâce à un Log-Rank test.

11681 L'objectif de ce projet est l'utilisation du laser pour détruire des tumeurs l'appareil digestif. L'application clinique visée est le traitement mini-invasif du cancer du pancréas.

Situé parmi les premières 5 causes de mortalité par cancer, ce cancer est responsable de la mort de plus de 300.000 personnes par an dans le monde, tandis que, considérée dans sa globalité, la survie à 5 ans des patients (autour de 4-5 %) après le diagnostic, reste médiocre. La chimiothérapie et la radiothérapie n'ont pas, en l'état actuel, de prétention curative. La chirurgie représente le seul espoir de guérison, mais elle reste encore très intrusive et applicable seulement pour les patients opérables (20% des patients au moment du diagnostic).

Le laser a des avantages : étant applicable par voie percutanée et endoscopique, il est beaucoup moins invasif que les chirurgies traditionnelles qui nécessitent des semaines de convalescence.

La lumière laser est amenée directement dans l'organe grâce à une fibre optique très fine (<1 mm), flexible et biocompatible. Le but est alors de détruire les cellules anormales avec la chaleur tout en protégeant les tissus en bonne santé qui entourent la tumeur.

La chirurgie au laser est déjà utilisée pour des procédures médicales, et pour traiter des tumeurs (glioblastome, par exemple), mais son utilisation sur de nouveaux organes, et en particulier le pancréas, nécessite une validation préalable avec des tests spécifiques (voie d'abord, accessibilité de l'organe, nature tissulaire...).

Les limites actuelles du traitement au laser sont le contrôle de la dose de lumière laser et de la chaleur appliquées dans la tumeur. Pour améliorer ces aspects, la solution envisagée se base sur 3 approches :

(i) l'administration d'un photosensibilisateur qui s'accumule spécifiquement au niveau des cellules tumorales. Une fois activé par une illumination laser à une longueur d'onde spécifique, il permettra la destruction de la tumeur tout en préservant les tissus sains ;

(ii) la mesure de la température en direct pendant la chirurgie au laser, pour s'assurer de l'effet thérapeutique de la lumière dans la tumeur ;

(iii) l'utilisation d'un logiciel qui calcule la dose optimale de la lumière pour chauffer toute la tumeur et protéger aussi les tissus périphériques sains.

Tous ces paramètres mesurés sont très importants pour assurer une procédure qui puisse s'adapter aux conditions propres à chaque patient.

De la recherche est encore nécessaire pour rendre la thérapie laser plus sûre et optimisée. Ce projet vise à valider un dispositif laser et son système de mesure sur un modèle animal proche de l'homme pour envisager ensuite sa validation en clinique. Cette étude est conduite dans le cadre d'un projet européen impliquant plusieurs institutions de recherche clinique et préclinique.

Les aspects techniques du dispositif ont été au préalable testés par des méthodes substitutives, il est à présent nécessaire de valider le système sur organisme vivant représentatif de la situation clinique (voies d'abord, complications, effets à long terme). Pour cela, le modèle porc a été retenu en vertu de sa taille qui permet de simuler l'anatomie humaine. Il offre les repères anatomiques recherchés par le praticien et permet d'utiliser les mêmes équipements et matériels chirurgicaux que chez le patient. En travaillant sur des organes très comparables à ceux des patients, la dosimétrie du laser et des photosensibilisateurs sera aussi très proche de celle applicable pour traiter les patients

54 animaux seront inclus dans l'étude « chirurgie au laser » dans le respect de la règle des 3 Rs : En remplacement préalable, plusieurs tests sur des modèles *in vitro* et *ex vivo* sont conduits avant l'expérimentation animale pour calculer une dosimétrie optimale du laser et de photosensibilisateurs. Des modèles mathématiques sont développés pour calculer les paramètres optimaux de la « chirurgie au laser » à utiliser sur les animaux. Le nombre d'animaux a été limité au strict nécessaire pour obtenir des résultats significatifs statistiquement, plusieurs procédures pourront être réalisées sur un même animal sans réveil (Réduction). L'étude sera conduite par étape avec une preuve de concept initiale qui permettra de raffiner les procédures, voire de réduire le nombre d'animaux utilisés en cours d'étude au vue des résultats préliminaires. Les interventions chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec gestion de la douleur (Raffinement). Des examens non invasifs post opératoires (scanner, IRM), tels que proposés en clinique pour le suivi des patients, seront réalisés régulièrement sur les animaux préalablement anesthésiés.

La surveillance et les soins aux animaux seront assurés par une équipe qualifiée de chirurgiens, vétérinaires et zootechniciens. La Structure en charge du bien-être animal accompagne le projet dans sa mise en œuvre, avec les conseils du vétérinaire désigné qui prendra les dispositions nécessaires au maintien du bien-être des animaux.

11682 Le tube digestif est un milieu complexe dans lequel coexistent des cellules de l'hôte, une grande diversité de microorganismes et des antigènes alimentaires. Les bactéries y jouent un rôle crucial pour le développement et le maintien d'un système immunitaire sain. Un déséquilibre du microbiote a été montré chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) ou de maladie métabolique comme l'obésité ou le diabète. Les MICI sont des maladies très invalidantes dont l'incidence est particulièrement importante dans les pays industrialisés. Ces dernières années la prévalence du diabète a été multipliée par quatre et les dépenses de santé liées au diabète dépassent les 850 trillions de dollars au niveau mondial. Il est donc essentiel de poursuivre les recherches qui pourront permettre le développement de nouveaux traitements.

Notre travail vise à mieux comprendre les interactions entre l'hôte et les bactéries intestinales et leurs rôles dans ces maladies. Nos travaux montrent l'impact de certaines souches bactériennes sur une voie de l'immunité innée appelée ALPK1 (ces bactéries sont appelées pro-ALPK1). Des mutations dans un gène crucial de cette voie sont associées à l'obésité. Nous émettons l'hypothèse que l'activation de cette voie ALPK1 par des bactéries intestinales pourrait impacter la santé,

notamment la mise en place du diabète et le développement des MICI. L'objectif de notre projet est donc d'explorer les propriétés protectrices de souches bactériennes pro-ALPK1 sur : i) l'intolérance au glucose et l'insulino-résistance dans un modèle *in vivo* de prédiabète induit par un régime riche en graisse, ii) l'inflammation intestinale dans un modèle de colite induite par le DSS (Dextran Sulfate Sodium) et dans un modèle de colite induite au DSS après un régime riche en graisse. Ces expérimentations seront réalisées à chaque fois sur deux lignées de souris : des souris transgéniques chez lesquelles la voie ALPK1 a été inactivée (Alpk1-KO) et des souris ne présentant aucune mutation qui seront utilisées comme contrôles. Sur 5 ans, nous testerons 6 souches que nous avons déjà identifiées comme ayant des propriétés pro-ALPK1. Ces 6 souches seront testées sur des souris C57BL/6 (sans mutations) et Alpk1-KO recevant un régime riche en graisses ou/et soumises à une colite.

Trois procédures différentes suivant le même schéma seront réalisées.

La procédure 1 vise à étudier le rôle protecteur de 6 souches pro-ALPK dans un modèle de prédiabète. Deux régimes seront administrés pendant 12 semaines : un régime riche en graisses ou d'un régime standard (contrôle). Chaque souche pro-ALPK1 sera administrée par gavage oro-gastrique quotidien pendant 12 semaines. 2 souches seront administrées par gavage à 2 lignées de souris soumis à 2 régimes alimentaires. Chaque groupe comprendra 10 animaux. Soit un total de 80 souris auxquelles s'ajoutent 40 témoins (les témoins recevant une solution saline par gavage x 2 lignées de souris x 2 régimes alimentaires x 10 animaux) ; Un essai comprendra 120 animaux. Tester les 6 souches simultanément nécessiterait la gestion de 280 souris simultanément. Un tel protocole expérimental n'étant pas réalisable, les souches seront testées deux par deux et au total 3 essais seront donc nécessaires pour tester les 6 souches : (A, B et C, D et E, F) = 3 x 120 = 360 souris

La procédure 2 correspond à l'induction d'une colite par traitement au DSS. Afin d'étudier le potentiel protecteur des souches pro-ALPK1, elles seront administrées par gavage oro-gastrique quotidien durant une semaine avant l'induction de la colite et ce jusqu'à l'euthanasie des animaux. Le DSS sera ajouté à 2.5% dans l'eau de boisson (pendant 7 jours). Comme dans la procédure 1, les souches seront testées 2 par 2, et la procédure comptera donc 3 essais de 120 souris, soit 360 souris.

Plusieurs études montrent que les régimes riches en graisse augmentaient le risque d'inflammation intestinale et de MICI. La procédure 3 associera une exposition de 12 semaines à un régime riche en graisse à un traitement au DSS 2.5% pendant 7 jours. Les propriétés protectrices des souches pro-ALPK1 seront testées via leur administration quotidienne durant une semaine avant l'induction de la colite et ce jusqu'à l'euthanasie des animaux. La procédure sera donc identique à la procédure 2 sauf que l'ensemble des souris recevra un régime riche en graisse mimant les régimes de type occidental. Comme lors de la procédure 2, les souches seront testées 2 par 2, et la procédure comptera donc 3 essais de 120 souris, soit 360 souris.

Au total, ce projet nécessitera 1080 souris.

Le poids et la prise alimentaire seront suivis 2 fois par semaine. Dans la procédure 1 l'installation du diabète sera suivie grâce à via des tests d'intolérance au glucose et d'insulino-résistance. Au moment de l'euthanasie pour l'ensemble des 3 procédures un prélèvement de sang sera effectué. Des prélèvements de différents tissus seront effectués après l'euthanasie des animaux pour des analyses biologiques, histologiques et moléculaires. Cette étude des relations entre les bactéries et l'hôte ne peut pas être réalisée *in vitro* ni modélisée *in silico*. Elle nécessite donc l'utilisation d'animaux. L'utilisation du modèle souris permet d'étudier les relations microbiote-hôte en lien avec les nombreuses données et méthodologies existantes sur ce modèle. Le nombre d'animaux prévu permet d'effectuer des tests statistiques (10 animaux par lot) sans nécessiter de répétition ultérieure de l'expérience. Toutes les souris auront dans chaque cage un enrichissement de milieu par l'ajout d'un abri obscur en polycarbonate. Les souris seront 5 par cage pour éviter l'isolement. Les gavages seront réalisés par du personnel expérimenté. Le suivi quotidien du poids des souris et de leur comportement permettra de détecter les points limites de l'expérimentation (prise ou perte de poids

excessive par rapport au poids de départ). Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

11683 Domaine et objectifs du projet :

Le tractus gastro-intestinal est un milieu complexe dans lequel coexistent des cellules épithéliales et immunes de l'hôte, une grande diversité de microorganismes et des antigènes alimentaires. Le microbiote intestinal est notamment composé de plusieurs milliards de microorganismes qui sont étonnamment bien tolérés par l'hôte. Dans certaines circonstances, la tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal est rompue, conduisant à une réponse immune et à une inflammation intestinale ou extra-intestinale. C'est notamment le cas dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comme la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). La rupture de cet équilibre s'illustre par ce que l'on appelle une dysbiose au niveau du microbiote du tube digestif c'est à dire une modification des quantités et des proportions des microorganismes composant le microbiote. C'est aussi ce que l'on observe lors de traitements antibiotiques à large spectre ou lors de modifications du régime alimentaire comme les régimes hyper gras et sucrés qui vont fortement désorganiser l'écosystème microbien intestinal. Alors que des données concrètes existent sur la modification des populations bactériennes, la composante fongique de ce microbiote est beaucoup moins connue. Nos travaux ont permis de montrer par des études sur l'animal et aussi sur des échantillons humains, que le microbiote fongique était modifié chez les patients atteints de MICI et que la modulation du microbiote bactérien par antibiothérapie influençait fortement les capacités pro ou anti-inflammatoires du microbiote fongique.

Le but du projet est de comprendre le rôle du microbiote fongique dans les interactions avec le système immunitaire intestinal et les bactéries du microbiote intestinal en comparant la situation normale (équilibre des différents microorganismes entre eux) à des dysbioses non symptomatiques comme lors d'antibiothérapie ou de régimes gras mais aussi au cours de l'inflammation. L'utilisation de probiotiques fongiques ou bactériens pourra être testée pour identifier de nouveaux moyens de lutte contre ces dysbioses et leurs effets.

Avantages et dommages attendus :

Grâce à des tests peu invasifs, cette étude va permettre d'identifier des cibles fongiques et/ou bactériennes bénéfiques ou néfastes à l'équilibre du microbiote intestinal. Des traitements antimicrobiens de même que l'apport de probiotiques bactérien ou fongique seront testés afin d'assurer un retour à l'équilibre, permettant ainsi le développement de nouveaux outils thérapeutiques.

Ces études s'appuieront sur des modèles d'inflammation, d'antibiothérapie ou de régimes gras déjà largement utilisés dans le laboratoire demandeur et les laboratoires scientifiques mondiaux.

Nombre et type d'animaux utilisés :

Dans ce projet qui s'intéresse à l'interaction entre les différentes populations du microbiote et les cellules de l'hôte (système immunitaire, cellules épithéliales) aucune alternative *in vitro* (culture cellulaire ou culture d'organe) n'est malheureusement possible. Trop d'éléments interagissent dans un environnement très spécifique mettant en jeu des réactions complexes chez l'hôte avec les différents types cellulaires présents dans l'intestin. L'utilisation des animaux est donc irremplaçable pour ce type de projet.

Pour ce projet nous utiliserons le modèle rongeur : des souris adultes sans modification génétique ou des souris génétiquement modifiées ayant des modifications de leurs voies de réponse du système immunitaire permettant la reconnaissance des champignons et des bactéries sont utilisés. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages reconnus et sont nés en captivité. Sur ce projet de 5 ans nous prévoyons d'avoir recours à un minimum nécessaire de 560 animaux par an soit un total de 2800 souris. Lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Nous avons également réduit au maximum le nombre de répétition et nous avons limité nos expérimentations à celles absolument indispensables.

Trois procédures expérimentales seront utilisées :

- Une colite induite par traitement chimique au dextran sodium sulfate. C'est une procédure qui dure 12 jours avec une période de 3 à 4 jours pendant laquelle une perte de poids et des diarrhées sont observées. Tous les prélèvements se font post mortem en fin d'expérimentation ou simplement par récolte de fèces.
- Une colite induite par infection bactérienne. C'est une procédure qui dure 23 jours avec une période de 3 à 4 jours pendant laquelle une perte de poids et des diarrhées sont observées. Tous les prélèvements se font post mortem en fin d'expérimentation ou simplement par récolte de fèces.
- Un traitement antimicrobien (antifongique ou antibactérien) couplée à l'ingestion de probiotiques bactérien ou fongique. Cette expérimentation mime des situations rencontrées fréquemment chez l'homme avec l'action concomitante d'antibiotique et de probiotique. Cette procédure sera effectuée sur 21 jours avec simplement collecte de fèces et prélèvement post-mortem.

Lors de ces procédures une attention toute particulière sera portée à l'état de santé de l'animal, qui sera euthanasié si les points limites sont atteints : poil hirsute, immobilité, baisse de poids de 20% entre le début de l'expérimentation et le jour de la mesure. Nous avons veillé à enrichir le milieu de vie par l'ajout de feuille de cellulose dans les cages et d'un abri prévu à cet effet. Les animaux seront hébergés par groupe de 6 maximum par cage. Le suivi attentif et quotidien des animaux sera réalisé par du personnel compétent afin de minimiser autant que possible la souffrance éventuelle des animaux.

11684 Chez les mammifères, la très grande majorité des neurones du cerveau est produite durant le développement embryonnaire. Ces neurones présentent une grande diversité, leur permettant d'acquérir des fonctions et des connectivités distinctes. Cette grande diversité de sous-types de neurones est codée de façon temporelle et spatiale, à partir de progéniteurs neuraux résidant dans les parois des ventricules cérébraux. En particulier, les progéniteurs dorsaux produisent les neurones excitateurs, alors que les progéniteurs ventraux produisent différents sous-types d'interneurones inhibiteurs.

Une lésion cérébrale entraîne une perte de ces neurones et donc une interruption des réseaux dans lesquels ils sont intégrés, résultant en des déficits fonctionnels souvent permanents. Régénérer ces neurones et les réseaux cérébraux associés représente la finalité des neurosciences régénératives. Deux sources de cellules sont actuellement envisagées pour atteindre ce but : 1) les progéniteurs neuraux postnataux, 2) la reprogrammation de cellules gliales en neurones. Cependant, la capacité régénérative de ces cellules est directement liée à leur compétence, c'est-à-dire leur capacité à produire différents sous-types de neurones. Cette compétence n'a pourtant jamais été étudiée de manière exhaustive.

Dans ce projet de recherche fondamentale, nous utiliserons des approches de transplantation pour étudier la compétence de ces deux types cellulaires. Ces approches permettront d'évaluer le devenir de ces cellules lorsqu'elles sont transplantées dans une autre région germinale (le gyrus denté de l'hippocampe), ou simplement dans le cerveau antérieur en développement. Ainsi, ces transplantations, dites hétérotopiques et hétérochroniques, respectivement, permettront d'étudier la capacité des cellules transplantées à générer des sous-types de neurones variés. L'espèce animale retenue pour ce projet est la souris. En effet, les techniques de manipulation génétique chez la souris sont robustes et reproductibles, nous permettant de marquer à l'aide d'une protéine fluorescente les cellules transplantées. De plus, les approches de transplantation décrites dans ce projet ont déjà été utilisées et optimisées chez la souris. Nous estimons qu'un nombre total de 280 souris seront nécessaire pour accomplir ce projet de 5 ans. Les procédures décrites dans ce projet peuvent être séparées en deux catégories : i) « procédures souris donneuses », destinées à maintenir les souris transgéniques (procédure 1) nécessaire au marquage à l'aide d'une protéine fluorescente des cellules à transplanter (procédure 2) ; ii) « procédures souris receveuses », destinées à transplanter les cellules d'intérêt dans le cerveau embryonnaire (procédures 3) ou postnatal (procédure 4). Toutes les souris donneuses seront euthanasiées afin d'isoler les cellules à greffer. Toutes les souris receveuses seront euthanasiés après exposition à la procédure 3 ou 4,

afin de récupérer les tissus et effectuer une analyse histologique poussée (marquages immunohistochimiques, reconstruction morphologique...).

Procédure 1 (Classe légère) : cette procédure de génotypage vise à maintenir les colonies de souris transgéniques nous permettant le marquage des cellules à transplanter. Les protéines rapportrices exprimées par cette approche (protéines fluorescentes) n'entraînent aucun effet néfaste sur les animaux.

Procédure 2 (Classe sans réveil) : Le marquage conditionnel des progéniteurs glutamatergiques postnataux nécessite une injection de tamoxifène. Cette drogue sera administrée par gavage chez la femelle portante et par injection sous cutanée chez les souriceaux.

Procédure 3 (Classe modérée) : cette procédure permet une transplantation et l'intégration homogène des cellules d'intérêt dans le cerveau en développement.

Procédure 4 (Classe modérée) : cette procédure permet une transplantation et l'intégration homogène des cellules d'intérêt dans l'hippocampe postnatal.

Ainsi, la transplantation de cellules marquées nous permettra de suivre leur devenir, de caractériser leur distribution et différenciation (c'est-à-dire leur compétence) en différents sous-types de neurones.

Application des 3Rs :

Remplacement : L'analyse *in vivo* reste incontournable pour ce projet de recherche. En effet, la différenciation des cellules progénitrices/reprogrammées dépend de mécanismes complexes d'origine intrinsèque mais aussi extrinsèque (c'est-à-dire venant de leur environnement). La complexité de ces influences extrinsèques ne pouvant être reproduite en culture, un modèle animal est donc nécessaire.

Réduction : Notre approche expérimentale nous permet de visualiser et donc analyser plusieurs centaines de cellules par animal. De plus, la méthode d'échantillonnage utilisée (coupes sériées) permet non seulement un échantillonnage homogène du cerveau, mais aussi l'utilisation de séries de sections issues d'un même cerveau pour des marquages immunohistochimiques variés, nous permettant de minimiser le nombre d'animaux nécessaire à ce projet. Enfin, nous avons mis en place dans l'équipe depuis plusieurs années un système de préservation de toutes les séries de coupes non utilisées. Cette banque de tissus permet d'optimiser sur le long terme l'utilisation du tissu tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : De nombreuses actions de raffinement seront mises en place lors des procédures décrites dans ce projet. Toute procédure de chirurgie (Procédures 3 et 4) sera accompagnée d'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques, et d'un suivi journalier des animaux afin de détecter et traiter immédiatement tout signe d'inconfort des animaux.

11685 La production de poulets standards repose sur l'utilisation de souches à croissance rapide et à fort rendement en viande. Ces animaux sont moins robustes vis-à-vis des pathologies éventuelles (exemple : colibacillose intestinale) ou des perturbations involontaires des conditions environnementales (exemple : stress thermique). Par ailleurs, la réglementation actuelle impose une diminution du recours aux antibiotiques lors de pathologies déclarées. Afin de renforcer les capacités de défense et d'optimiser la santé notamment intestinale de ces animaux plusieurs additifs alimentaires peuvent être utilisés. Des extraits d'algues riches en polyphénols et/ou polysaccharides pourraient avoir des effets bénéfiques de par leurs propriétés anti-oxydantes. Ces extraits contiennent également différents oligo-éléments pouvant favoriser la croissance osseuse. L'objectif de la présente étude est de comparer des régimes contenant une huile oxydée et supplémentés avec trois doses différentes d'un extrait d'algues avec des régimes contrôles contenant une huile normale ou oxydée, cette dernière étant supplémentée ou non avec une forte dose de vitamine E (200 ppm). Sur un total de 1000 animaux commandés, 960 seront élevés mais seulement 72 seront soumis à l'âge de 21 jours à trois prises de sang espacées de 8 h pour établir la cinétique de réponse des systèmes antioxydants des animaux placés en situation de stress thermique. A l'âge de 35 jours, une prise de sang sur 72 animaux sera de nouveau effectuée pour déterminer le statut antioxydant des animaux juste avant l'abattage. Il s'agira d'analyser la réponse

des poulets en termes de performances de croissance, de qualité de la carcasse et de la viande, de qualité de la croissance osseuse et de capacité anti-oxydante globale. Celle-ci sera testée lors d'une exposition de 72 poulets à une diminution de la température d'élevage (14-16°C vs. 20°C) pendant 16 h à l'âge de 21 jours et en fin d'élevage par la mesure de la sensibilité à l'oxydation de la viande qui aura été enrichie en acides gras n-3 grâce à une supplémentation alimentaire en graines de lin. La sensibilité à l'oxydation de la viande sera également exacerbée par la distribution d'un aliment contenant de l'huile oxydée.

Réduction : pour limiter le nombre d'animaux mis en élevage, l'expérimentation ne portera que sur des poulets mâles qui sont plus sensibles aux variations de températures que les femelles. Ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour échantillonner suffisamment de tissus et tirer des conclusions significatives selon notre expérience. Les femelles produites simultanément par le couvoir seront destinées à des productions commerciales.

Remplacement : Compte tenu de l'objectif appliqué du projet en nutrition animale et zootechnie, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*.

Raffinement : les poulets seront élevés en groupes et feront l'objet d'une surveillance quotidienne. Toute manifestation de symptômes comportementaux persistants définis par un point limite entraînera le retrait de l'animal de l'expérimentation et son euthanasie.

11686 Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est une pathologie intestinale chronique, multifactorielle impliquant des facteurs génétiques, environnementaux, et nutritionnels qui se caractérise notamment par une augmentation de la perméabilité intestinale et une hypersensibilité viscérale. Le SII est le trouble fonctionnel gastrointestinal le plus répandu. Il affecte 15% des adultes (avec une prévalence plus importante chez les femmes) dans les pays occidentaux, induit de la morbidité, affecte négativement la qualité de vie, réduit la productivité au travail et représente un fardeau pour les patients et la société. Une meilleure compréhension de cette pathologie par la caractérisation des facteurs de risques et de marqueurs prédictifs est donc nécessaire pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. L'occurrence d'évènements adverses en période périnatale est un facteur de risque important dans l'épidémiologie du SII. Le but de ce projet de recherche est d'étudier la réponse immunitaire chez le nouveau né dans deux modèles de fragilisation du nouveau né chez la souris : le stress de séparation maternelle (SSM) et une infection néonatale parasitaire à *Cryptosporidium parvum*. Le SSM ou une infection avec le parasite intestinal *Cryptosporidium parvum* (CP) en période néonatale chez les rongeurs sont des modèles expérimentaux connus pour induire chez les adultes des symptômes similaires au SII que sont l'hypersensibilité viscérale et l'augmentation de la perméabilité intestinale cependant la réponse immunitaire et/ou la physiologie intestinale chez ces animaux n'est pas décrite chez le nouveau né.

L'objectif de ce projet de recherche est d'identifier des marqueurs communs à ces 2 modèles prédictifs de la symptomatologie du SII chez les jeunes âgés de J7, J15 et 21 jours

Ce projet de recherche a pour but d'analyser différents paramètres physiologiques (la réponse immunitaire, la barrière intestinale) et nécessite donc de travailler sur l'animal, aucun substitut *in vitro* n'est envisageable. Toutefois, malgré les 2 modèles à tester (*cryptosporidium parvum* et stress de séparation maternel), l'utilisation d'outils statistiques va nous permettre de minimiser le nombre d'animaux à utiliser pour obtenir un résultat concluant.

Nous utiliserons 1212 animaux = 1080 souriceaux + 132 mères.

La règle des 3R sera strictement respectée.

Réduire et raffiner : les animaux sont élevés avec du sopalin pour qu'ils soient bien dans le nid de la mère et éviter du cannibalisme.

Du point de vue statistique, nous répéterons les expériences trois fois, et nous utiliserons des modèles statistiques mixtes qui tiennent compte à la fois des facteurs à effet fixe (exemple Infection ou stress de l'animal) et des facteurs à effet aléatoire (répétition des expériences).

Des points limites ont été définis pour palier à d'éventuelles douleurs

Remplacer : l'étude de l'immunologie mucoale ne peut être réalisée sans expérimentation animale. En effet, les études *in vitro* ne tiennent pas compte de la complexité des coopérations cellulaires.

11687 Ce projet a pour objectif de permettre à nos clients d'étudier la pharmacocinétique ou la pharmacodynamie de produits vétérinaires canins chez le chien.

Pour le développement d'un produit vétérinaire, les différentes formulations candidates doivent être comparées entre elles afin de déterminer celle qui est la plus adaptée pour le traitement de l'animal.

Chaque test sera réalisé comme suit : pour chaque formulation, 3 à 12 chiens seront traités à la posologie recommandée par le fabricant et les volumes administrés ne dépasseront pas les recommandations du Gircor. Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, chaque chien pourra recevoir séquentiellement chacune des formulations. Entre chaque test, des périodes de repos suffisantes seront respectées.

La pharmacocinétique ou la pharmacodynamie reposera sur des prélèvements sanguins, et/ou tout autre prélèvement non invasif comme la récolte de fèces. La fréquence et le volume des prélèvements seront déterminés en fonction du respect du bien-être et de la santé des animaux, et respecteront les recommandations du Gircor.

L'estimation du nombre d'animaux requis pour ce projet sur 5 années est de 270 chiens, ce nombre pouvant être diminué par la réutilisation des animaux.

L'utilisation de chiens sur ce projet est justifiée par le fait qu'ils représentent l'espèce cible du produit et qu'il n'existe pas de méthode de remplacement pour ce type de test.

11688 L'acide hyaluronique est un des composants principaux de la peau et joue un rôle majeur dans le maintien et la formation de la matrice extracellulaire. Au niveau cutané, il participe à l'hydratation et à la cohésion des tissus. De par ces propriétés, il est utilisé en chirurgie reconstructive et classifié comme dispositif médical injectable. L'acide hyaluronique est ainsi utilisé dans le traitement de la lipoatrophie faciale ou de l'asymétrie morphologique. Cependant des complications cutanées peuvent se développer chez certains sujets post injections. Ces complications ne semblent pas directement liées au gel d'acide hyaluronique neutre (non dégradé) mais aux produits de dégradation de l'acide hyaluronique. En effet, au cours du temps, des enzymes dégradent l'acide hyaluronique et des produits de dégradation de différentes tailles peuvent être à l'origine de réponses inflammatoires non désirées. Notre hypothèse principale est que les fragments d'acide hyaluronique formés au cours du temps (en particulier les fragments de petite taille) induiraient une inflammation chez les patients qui présentaient au préalable une inflammation bas grade non diagnostiquée. Les mécanismes d'actions des fragments d'acide hyaluronique et leur potentiel inflammatoire sont très peu étudiés.

Des résultats *in vitro* montrent que des fragments d'acide hyaluronique induisent une réponse inflammatoire exacerbée dans un environnement cellulaire inflammatoire. La recherche sur modèle *in vivo* permettra d'identifier les mécanismes impliqués et de caractériser l'environnement à l'origine de réponses inflammatoires non attendues après injection d'acide hyaluronique. Suivant notre hypothèse de départ, ce projet nécessitera de mettre en place un modèle inflammatoire bas grade murin, pouvant potentiellement reproduire les réactions inflammatoires cutanées observées post injections afin de comprendre ce que l'on observe en clinique chez l'homme.

L'objectif de cette étude est d'évaluer *in vivo* chez la souris saine si l'inflammation suite à l'injection intradermique d'acide hyaluronique est spécifique à la présence d'un microenvironnement inflammatoire préalable et si elle dépend de la taille des fragments d'acide hyaluronique. Notre projet respecte la règle des 3R.

La réactivité inflammatoire et vasculaire cutanée repose sur une interaction complexe des systèmes immunitaires et vasculaires nécessitant une approche *in vivo*. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée. Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Les souris seront suivies avec un soin

particulier, elles seront observées quotidiennement et pesés 1 fois par semaine. Les points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

Ce projet concernera 1500 souris au maximum.

11689 L'inflammasome NLRP3 est un complexe protéique qui régule l'inflammation au sein de notre organisme. Il joue d'ailleurs un rôle primordial dans de nombreuses pathologies humaines inflammatoires telles que la goutte ou le diabète de type 2. Des études récentes ainsi que des observations réalisées par notre équipe démontrent que l'inflammation favorise la croissance des cellules tumorales. Les objectifs sont de mieux comprendre les fonctions physiologiques de NLRP3 *in vivo*.

Le but de ce projet est de générer des nouvelles lignées de souris génétiquement modifiées et dans un premier temps valider l'absence de phénotype dommageable après délétion des gènes d'intérêt chez la souris adulte. Une fois ces modèles validés, ils seront utilisés pour mieux comprendre le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans les tissus.

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée ; Réduction du nombre d'animaux sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Raffinement : Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des souris minimum 2 fois par semaine, permettra d'éviter leur souffrance. Aucun phénotype dommageable à prévoir puisque les souris KO conventionnels n'en ont pas. Cependant dans le cadre du suivi des animaux, l'aspect des poils, la prostration et le poids des souris seront les paramètres majeurs pris en compte pour démontrer l'absence de phénotype.

Seulement 26 animaux seront utilisés dans le protocole décrit.

11690 Les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC) ont une force musculaire diminuée par rapport aux sujets sans atteinte rénale. Cette diminution de la force musculaire conduit à la perte d'autonomie, aux chutes et à la diminution de la qualité de vie des patients. Notre équipe a rapporté une diminution de la force musculaire chez plus de 80% des patients hémodialysés en centre. De façon surprenante, la force musculaire était diminuée chez plus de 80% des patients alors que seuls environ 1/3 des patients avaient une diminution de la masse musculaire. Les raisons qui conduisent ces patients à une diminution de la force musculaire sont multiples : dénutrition, sédentarité, âge, neuropathie etc... Parmi ces raisons, une hypothèse souvent proposée est l'action des toxines urémiques. Les toxines urémiques sont des substances qui s'accumulent au cours de l'IRC et exercent une action néfaste pour la santé. Très peu de travaux ont pu expliquer la physiopathologie de l'action des toxines urémiques sur le muscle. Notre équipe a retrouvé une corrélation entre les taux plasmatiques d'une toxine urémique, l'indoxyl sulfate (IS), et la force musculaire chez des patients hémodialysés.

De nombreuses études ont rapporté une raréfaction du nombre de capillaires au sein du muscle des patients atteints d'IRC ainsi que dans les modèles animaux d'IRC. Or l'IS est particulièrement impliquée dans l'angiogenèse : Cette toxine agit grâce à un récepteur nommé AhR.

Notre projet a pour but d'analyser si l'IS joue un rôle toxique sur la fonction musculaire et si son récepteur AhR est impliqué. Ces données apporteront de nouvelles données dans la compréhension de la physiopathologie et du rôle de l'IS et d'AhR dans les processus de dysfonction musculaire au cours de l'insuffisance rénale chronique. Il pourrait avoir des conséquences dans la prise en charge des patients afin d'améliorer leur autonomie et leur qualité de vie.

Ce projet nécessite donc l'utilisation d'un modèle de souris invalidée pour le gène codant AhR, chez laquelle une insuffisance rénale chronique sera induite afin de valider nos hypothèses. Les modèles animaux d'insuffisance rénale chronique sont des outils importants pour l'étude des événements pathophysiologiques de la maladie rénale permettant ainsi des études translationnelles dont le but est d'améliorer la prise en charge des patients IRC.

Afin de respecter les règles d'éthique, la règle des 3R (« Réduction/Raffinement/Remplacement ») sera appliquée. Seules les expériences considérées comme absolument indispensables seront réalisées afin d'utiliser le moins d'animaux possibles (réduction) : rédaction d'un protocole

expérimental avant toute expérimentation, utilisation des statistiques lors de la conception du protocole expérimental pour une estimation préalable du nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux afin d'obtenir plus d'informations pertinentes à moindre coût en termes de "mal être" animal (raffinement). Avant chaque intervention chirurgicale, les souris recevront du carprofen (Anti inflammatoire Non Stéroïdien) afin de limiter la douleur (analgésie préventive). Les animaux seront opérés sous anesthésie générale (kétamine / xylazine) à raison d'une injection en intrapéritonéale. Pour soulager la douleur, de la buprénorphine sera injectée (sous cutanée) avant les interventions chirurgicales et en post-op (à J1). A la fin de la chirurgie, les souris seront laissées sur le tapis chauffant jusqu'à leur réveil, sous surveillance. Elles seront ensuite hébergées dans des cages individuelles jusqu'à la cicatrisation totale de la peau puis par groupes de 2 à 4 individus par cage. Un enrichissement sera mis en place par l'ajout de matériaux de nidification de type « Nestlets » dans les cages.

Les animaux resteront sous surveillance journalière pendant la durée entière des procédures. L'état moribond de l'animal et la mort seront évités en tant que point limite. La douleur ou la détresse de l'animal constitueront des points limites et des mesures seront prises pour les soulager en se basant sur l'évaluation de cinq aspects de l'état d'un animal : variation du poids de l'animal, apparence physique externe, signes cliniques mesurables (ex : changements du rythme cardiaque, du rythme respiratoire et de la nature de ceux-ci), changement dans les comportements non provoqués, réponses comportementales aux stimuli externes. Au moyen d'une grille d'évaluation de la douleur, nous déterminerons un score et agirons en conséquence (analgésie voire arrêt de l'expérimentation par euthanasie de l'animal). A chaque fois que cela sera possible, des modèles *in vitro* seront développés à la place des modèles *in vivo* (remplacement). Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux pour chaque groupe, nécessaire à la réalisation d'un test statistique non paramétrique, soit un total de 64 souris.

11691 En France, le retard de croissance in utero (RCIU) touche environ 1 bébé sur 10. Un RCIU compromet, à la fois, la santé de la mère et celle du fœtus. Le retard de croissance fœtale est responsable chez l'enfant d'un taux élevé de prématurité induite, de déficit cognitif, de troubles du comportement, et de pathologies cardio-vasculaires à l'âge adulte.

L'anomalie placentaire est la principale cause du RCIU. Les échanges qui s'opèrent entre la mère et le fœtus, via le placenta, dépendent du volume placentaire et du flux sanguin s'établissant dans celui-ci.

Le modèle animal de RCIU étudié a été un modèle d'hypoperfusion placentaire par ligature d'une des artères utérines chez la rate.

La seule technique d'imagerie pour la mesure de la perfusion sanguine disponible et utilisable à la fois *in vivo* en recherche clinique et préclinique est l'échographie Doppler avec utilisation d'agent de contraste (microbulles). Cependant les résultats obtenus mettent en évidence un manque de reproductibilité (variabilité importante des résultats) de la méthode. L'utilisation de l'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) apparaît comme une alternative possible pour caractériser le RCIU. Le but de ce projet est de mettre au point un protocole IRM *in vivo* avec agent de contraste afin d'évaluer *in vivo* la perfusion placentaire dans un modèle animal de retard de croissance chez la rate gestante.

L'IRM est une technique qui est maintenant reconnue et largement utilisée en routine clinique. Cette méthode qui utilise des champs magnétiques et qui n'utilise ni rayons X ni rayonnements ionisants. Elle est non invasive et atraumatique.

Ce projet devrait permettre de comprendre si le RCIU peut s'expliquer par une anomalie de la perfusion placentaire et des échanges qui s'opèrent entre la mère et le fœtus. De plus il devrait permettre de mettre en place des paramètres quantitatifs IRM pour caractériser cette anomalie de la perfusion.

Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal rat est fondamental dans notre cas, puisque l'étude préclinique en particulier ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés scrupuleusement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles.

Dans notre étude 400 rats seront utilisés.

11692 Le cerveau est constitué de 100 milliards de cellules nerveuses appelées neurones qui établissent chacun 10000 connexions avec les autres neurones du cerveau. Ces connexions appelées synapses, transmettent l'information d'un neurone à l'autre. Ce phénomène est à l'origine de nos facultés d'apprentissage et de mémorisation. Nous avons montré qu'une petite molécule appelée SUMO pouvait réguler le flux d'information entre les neurones du cerveau. Ainsi, notre hypothèse de travail est qu'un défaut dans la production de cette molécule dans les neurones pourrait conduire à des anomalies de communication cérébrale et en conséquence à de nombreux désordres neurologiques. Nos expériences ont donc pour but d'avancer notre compréhension du rôle de cette molécule au niveau neuronal ce qui permettra à moyen terme de comprendre comment les cellules nerveuses communiquent entre elles, et à plus long terme, d'étudier les pathologies du système nerveux où la communication entre les neurones du cerveau est altérée. Notre projet nécessite l'utilisation de cultures primaires de neurones qui seront réalisées à partir d'embryons de rat. Notre projet fait donc intervenir l'utilisation de rates Wistar gestantes sauvages commerciales qui présentent un phénotype non dommageable.

A cause de la particularité physiologique unique des neurones qui consiste en l'impossibilité de se diviser et de l'absence de lignées cellulaires permettant d'approcher la complexité neuronale, l'utilisation de cultures primaires de neurones reste à ce jour inévitable. Nous ne pouvons donc pas appliquer le principe de remplacement. Le système de culture primaire de neurones que nous utilisons est standard et utilisé par tous les groupes de recherche à travers le monde. Ainsi, la culture primaire de neurones (réalisée à partir d'embryons de rat à 17 jours embryonnaires) reste une approche indispensable pour la réalisation de notre projet.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, un calcul du nombre d'animaux nécessaire a été réalisé afin de pouvoir valider nos résultats statistiquement comme décrit dans la procédure 1.

Les cerveaux des femelles gestantes seront prélevés et utilisés pour réaliser les études biochimiques au stade adulte.

Ce projet ne comporte qu'une procédure de classe légère. La procédure mettant en œuvre des animaux dans ce projet sera réalisée dans l'optique de minimiser la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux dans une optique de raffinement. Notamment, les conditions d'hébergement seront standardisées et en adéquation avec le bien être des animaux, de façon à obtenir des animaux stabilisés de manière la plus homogène possible, ceci diminuera les variations entre individus pour les analyses statistiques. Les rates gestantes utilisées seront hébergées en cage réglementaire. Chaque environnement sera enrichi pour leur bien-être avec des maisonnettes en polycarbonate (igloo rouge) et carrés de ouate, ainsi que des morceaux de bois, mis sous la litière afin de stimuler la curiosité des animaux. Les méthodes d'euthanasie utilisées sont réglementaires et sont choisies afin de respecter le bien être animal de par leur efficacité d'exécution.

Le nombre total d'animaux qui sera utilisé sur les 5 ans du projet afin de pouvoir réaliser des expériences contrôlées avec une reproductibilité adéquate est de 1430 animaux comprenant 130 rates adultes et 1300 embryons.

11693 La recherche de matières premières produites localement est une préoccupation majeure en production porcine, en particulier pour s'affranchir de l'utilisation de matières premières d'importation. Les phases de développement de ces nouvelles matières premières nécessitent d'abord de mesurer leurs valeurs nutritionnelles, puis de valider ces valeurs nutritionnelles lors d'essais où les performances de croissance des animaux sont mesurées précisément. L'objectif du

projet est de mesurer la consommation d'aliment et les performances de croissance des porcs pendant la phase de croissance-finition (de 25 à 115 kg de poids vif, soit pendant une durée de 100 jours) lorsque les animaux reçoivent un aliment contenant les matières premières à tester. Pour cela, les animaux sont hébergés individuellement et leur consommation d'aliment est mesurée quotidiennement. Les animaux sont pesés toutes les semaines et leur épaisseur de lard dorsal est mesurée toutes les 2 semaines. Le statut métabolique des animaux est évalué par des prises de sang effectuées toutes les 4 semaines. Une caractérisation de la flore digestive des animaux est réalisée par prélèvement de fèces toutes les 4 semaines.

Le projet est prévu pour une durée de 5 ans. Annuellement, nous estimons avoir à mettre en place 15 modalités expérimentales. Pour chaque modalité expérimentale, il est nécessaire de prévoir 20 animaux, soit 300 animaux par an et 1500 animaux pendant toute la durée du projet.

Règle des 3R. Le remplacement n'est pas possible car l'utilisation d'animaux est inhérente au type d'étude (caractérisation des nouvelles matières premières pour l'espèce-cible). Nous avons réduit le nombre d'animaux au minimum statistique en fonction des mesures effectuées. Toutes les mesures seront réalisées par du personnel formé et expérimenté. Les animaux bénéficieront d'un suivi très proche par les animaliers ainsi que par les différents intervenants. Toute intervention potentiellement douloureuse ou stressante sera contrôlée, et les animaux suivis dans les minutes ou heures qui suivent. En cas de souci de santé, le vétérinaire sera consulté et les animaux traités en conséquence. A la fin de l'étude et si les matières premières sont inscrites au catalogue officiel de l'Union Européenne, tous les animaux seront commercialisés.

11694 Le principe d'action de la vaccination a été expliqué par Louis Pasteur et ses collaborateurs Emile Roux et Emile Duclaux, à la suite des travaux de Robert Koch ayant établi le lien entre les micro-organismes et les maladies infectieuses. La vaccination est prophylactique et donc préventive de l'infection. Ils induisent chez un hôte des réactions immunitaires protectrices qu'il développe normalement, en réponse à une attaque par un agent pathogène.

La vaccination consiste à stimuler des réponses immunitaires adaptatives protectrices contre des micro-organismes en exposant l'individu à des formes non pathogènes (vaccins vivants atténués, inactivés) ou à des composants des micro-organismes (sous-unités d'agents infectieux). Le vaccin est constitué d'une partie antigénique spécifique du pathogène contre lequel il doit protéger, laquelle induira une réponse immunitaire avec production de cellules mémoire.

Les antigènes vaccinaux peuvent être des protéines responsables d'une activité du pathogène, inactivées avant leur administration ou il peut également s'agir de protéines cibles des anticorps protecteurs. Pour la majorité des vaccins inactivés (ne comportant pas de microbe vivant), la présence d'adjuvants (du latin *adjuvare* (aider), est indispensable pour permettre une réponse immunitaire entraînant une protection. L'ajout d'adjuvant dans les vaccins permet, par ailleurs, de diminuer la quantité d'antigènes par dose vaccinale, et de réduire le nombre d'injections.

L'objectif de ce projet est de réaliser une caractérisation approfondie de 3 nouveaux candidats adjuvants en combinaison avec un antigène de référence. D'une manière générale, les adjuvants renforcent durablement la réponse immunitaire induite par les vaccins, nécessaire pour obtenir une protection contre la maladie. Cette étude vise à mieux comprendre ces mécanismes d'actions qui sont pour la plupart encore inconnus.

Il n'existe pas de modèle *in vitro* pertinent permettant de reproduire la majorité des interactions entre sous-unité antigénique associé à un adjuvant vis-à-vis du système immunitaire. Les modèles murins permettent de prédire la stratégie à déployer chez les patients pour le choix d'adjuvants et l'optimisation de la vaccination

Cette étude comportera 3 procédures (2 légères et 1 modérée). La première non invasive permettra d'établir le profil de biodistribution antigène et/ou adjuvant(s) préalablement rendu(s) fluorescents avec des systèmes d'imagerie. Ceci nous permettra d'optimiser le nombre des points d'étude/suivi permettant ainsi de réduire le nombre de souris utilisées : (2) La deuxième, consiste à comparer la réponse immunitaire vis-à-vis des différents candidats adjuvants associé à l'antigène. (3) La troisième permettra d'étudier la signature moléculaire des nouveaux adjuvants. Au cours de ces

différentes procédures, un suivi clinique sera réalisé quotidiennement de façon à intervenir au plus tôt si un animal montre des signes d'inconfort, de stress ou de souffrance. Les souris seront anesthésiées au cours des manipulations invasives.

L'utilisation des systèmes d'imagerie adaptés au petit animal permettra un suivi quotidien non invasif de la biodistribution des adjuvants et/ou antigènes et une réduction considérable du nombre de souris à utiliser. Le nombre minimal d'animaux à inclure pour pouvoir appliquer des tests statistiques pour petits échantillons a été déterminé en collaboration avec des biostatisticiens. 850 souris seront utilisées sur 5 ans.

11695 Pour synchroniser les chaleurs et les ovulations chez la chèvre afin de réaliser une insémination artificielle, les filières d'élevage utilisent des traitements hormonaux qui comprennent une phase progestative sous la forme d'une éponge vaginale imprégnée d'un analogue (FGA) de la progestérone (P4) laissée en place une dizaine de jours. Cette imprégnation permet l'expression d'un comportement d'oestrus et la mise en place d'un cycle de durée normale après l'ovulation. Mais ces traitements à base de stéroïdes de synthèse ne sont pas utilisables en élevage biologique et sont de plus en plus contestés dans les élevages en général. Nous avons donc entamé un programme d'exploration de la présence de progestérone à l'état naturel dans un certain nombre de plantes, leur utilisation étant alors autorisée dans les élevages ci-dessus mentionnés. Nous avons mis en place des mesures sur une plante de nos campagnes potentielle candidate à utiliser pour une distribution orale.

Le programme consiste donc à mesurer (1) les concentrations plasmatiques sanguines de progestérone après distribution orale, sous forme de granulés ou de dose individuelle per os, (2) l'efficacité clinique sur le comportement d'oestrus et l'ovulation des préparations mentionnées.

Ce programme s'étalera sur 5 ans où nous serons amenés à tester 15 groupes de 6 animaux, soit un total de 90 chèvres.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacement : la complexité de la digestion ruminale et du métabolisme des stéroïdes dans l'organisme *in toto* ne peut pas être remplacée par des systèmes alternatifs

Réduction : le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé afin de ne pas utiliser plus d'animaux que nécessaire, tout en conservant une bonne mise en évidence statistique

Raffinement : Les animaux ovariectomisés recevront un traitement anti-douleur ; tous les animaux seront hébergés dans les conditions classiques du laboratoire, en groupe social sur paille et avec enrichissement (casse en bois pour grimper) et le nombre de prises de sang permettra de mettre en évidence l'effet recherché.

11696 Le glioblastome est une tumeur cérébrale dont le pronostic est très défavorable avec une survie médiane de 15 mois malgré un traitement combinant chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie, ce qui nécessite de trouver urgemment de nouvelles solutions thérapeutiques. L'amélioration de la distribution des médicaments dans l'organisme est un véritable enjeu dans la prise en charge thérapeutique des patients cancéreux. Le paclitaxel (PTX) est une molécule utilisée en clinique mais de structure très hydrophobe, propriété qui limite sa bonne pénétration cellulaire et qui restreint son emploi. Une méthode efficace pour améliorer l'efficacité du PTX serait de le transformer en actif plus hydrosoluble et de taille nanométrique afin de modifier son mécanisme de pénétration intracellulaire et faciliter son internalisation. Nous avons démontré au laboratoire l'innocuité, la biocompatibilité et l'internalisation des nanoparticules de carbone (CNP) sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses *in vitro* (incluant des lignées de glioblastome). De plus, l'activité anti-cancéreuse des CNPs couplées à du paclitaxel (CNP-PTX) a été validée par plusieurs tests *in vitro*. Par ailleurs les CNPs-PTX sont hydrosolubles.

Nous souhaitons maintenant savoir si les CNPs-PTX possèdent une activité anti-tumorale *in vivo* par une étude d'efficacité sur souris nude porteuses de cellules humaines de glioblastome après greffe sous-cutanée. Cette étape de validation *in vivo* est indispensable avant toute évaluation clinique chez le patient. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode qui pourrait se substituer

à l'expérimentation animale dans ce domaine. Quatre groupes d'animaux porteurs d'une tumeur (10 animaux par groupe) seront constitués afin de tester quatre formulations différentes qui seront administrées, directement dans la tumeur sous-cutanée des souris : 1) CNPs- PTX, 2) CNPs seules, 3) PTX seul, 4) Solvant (PBS).

Dans le souci du respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux prévus dans chaque groupe est basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 80% de chance d'arriver à un résultat statistiquement significatif. Pour le bien-être de l'animal, les souris seront logées selon les normes requises avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) et en groupes de 5 individus par cage (365x205x140 cm, 530 cm²) afin d'éviter le stress de l'isolement. Les injections (greffe sous-cutanées et traitement intratumoral) seront réalisées sous anesthésie afin d'assurer une bonne reproductibilité de leur exécution, et nous prévoyons d'administrer de l'analgésie en peri- et post-opératoire si nécessaire.

Après la greffe nous suivrons la progression de la pathologie en mesurant la taille de la tumeur mesurée 3 fois par semaine depuis son apparition. Les souris seront observées quotidiennement et le poids des animaux mesuré quotidiennement, en observant tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation, ataxie) et en nous appuyant sur une grille d'évaluation de la douleur. Lorsque les souris présenteront un volume tumoral ≥ 1500 mm³, une perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids initial (masse tumorale déduite) ou si des signes cliniques apparaissaient, les animaux seront mis à mort sans délai.

Au total, un maximum de 40 souris est prévu pour cette étude.

11697 Un nombre conséquent d'étudiants en pharmacie et la majorité des étudiants du master « sciences du médicament » sont appelés à être de futurs cadres dans l'industrie pharmaceutique. Pour les former à leur pratique professionnelle, certains enseignements se font sous forme pratique : les travaux pratiques ou Tp.

Objectif : dans les Tp de Physiologie/Pharmacologie nous illustrons les effets de certains médicaments étudiés en théorie lors des cours. Les protocoles utilisés lors de ces Tp sont semblables à certains des protocoles utilisés pour l'évaluation et la validation de l'effet d'un médicament. Sur un rat anesthésié et préparé par les enseignants, les étudiants préparent la solution contenant leur molécule, qui sera injectée par l'enseignant. Puis, les étudiants mesurent les effets de ce médicament sur l'électrocardiogramme (ECG) et les paramètres ventilatoires (fréquence respiratoire, durée et profondeur des inspirations, degré de bronchoconstriction). Les animaux seront euthanasiés à la fin du Tp.

Pour ces Tp, nous avons prévu d'utiliser 205 rats sur une période de 5 ans. Afin de limiter l'utilisation d'animaux, nous avons remplacé, réduit et raffiné nos pratiques éducatives.

Remplacer :

La mise en œuvre d'expériences « réelles » est nécessaire à la formation spécifique des Pharmaciens et étudiants en Master. En effet, le modèle animal est le seul qui permet une analyse globale de la réponse à un médicament : présence du système nerveux et interaction de tous les organes, ce que ne permet pas un système cellulaire *in vitro*.

Nous disposons en parallèle, de logiciels de simulation d'expériences (Enseignement Assisté par Ordinateur, EAO). Ces logiciels représentent des outils pédagogiques offrant une alternative intéressante aux traditionnelles préparations utilisées en TP. Néanmoins, ces logiciels sont très limités dans le choix et le réalisme des expériences proposées. Ces logiciels nous permettent de remplacer, pour des contenus pédagogiques précis, des animaux : environ 50% des séances sont réalisées en EAO. Par contre, les molécules testées sont synthétisées par les étudiants, donc l'EAO ne peut mimer les variations physiologiques induites par les différences de synthèse. Nous ne pouvons pas nous affranchir du modèle animal pour cette partie des Tp. Ces expériences d'EAO permettent toutefois de remplacer une vingtaine de rats par an.

Réduire :

Afin de limiter l'utilisation d'animaux, les étudiants sont répartis en binôme ou trinôme pour cette série de Tp, ce qui est la taille limite pour obtenir l'intérêt pédagogique de cet enseignement.

Raffiner :

Pendant la période des Tp (3 semaines en Mars, 1 semaine en Avril, 1 semaine en Novembre), les rats (250 g à 350 g – 7 à 8 semaines) sont hébergés par 2 dans des cages de 820 cm² avec des enrichissements sous forme de morceaux de bois pour que les animaux puissent user leurs dents. Les expérimentations se font sous anesthésie d'environ 1h 30 et les enseignants contrôlent la profondeur de l'anesthésie avant la chirurgie et pendant toute la durée du Tp grâce au monitoring ECG et respiratoire et la température des animaux est maintenue à l'aide de patch autochauffant activable (chaufferette corps aptonia). Les enseignants, formés à l'expérimentation animale, anesthésient les animaux puis injectent les solutions préparées par les étudiants soit en injections Intrapéritonéales, soit en injections intraveineuse à l'aide d'un cathéter implanté dans la veine jugulaire de l'animal.

11698 Vingt deux espèces de cétacés ont été recensées dans les eaux réunionnaises. Les trois espèces de delphinidés côtiers les plus communément observées dans les eaux réunionnaises sont le grand dauphin de l'Indo-Pacifique (*Tursiops aduncus*), le grand dauphin commun (*Tursiops truncatus*) et le dauphin long bec (*Stenella longirostris*). Une campagne de biopsie sur ces espèces, notamment en vue d'analyses isotopiques, a été menée de 2010 à 2013. C'est ainsi que 33 échantillons de peau et de lard de grand dauphin de l'Indo-Pacifique ont été collectés et analysés. Néanmoins, seulement 12 échantillons cutanés ont pu être collectés concernant le grand dauphin commun et 21 pour le dauphin long bec. Ce faible nombre d'échantillons rend les analyses isotopiques statistiquement peu fiables pour ces deux espèces, d'où la nécessité de collecter un nombre de biopsies supplémentaire. De plus, aucune analyse isotopique sur la peau et le lard d'espèces de cétacés pélagiques autour de La Réunion (telles que le dauphin tacheté pantropical *Stenella attenuata* ou le dauphin d'Electre, *Peponocephala electra*) n'a jamais été faite.

A la Réunion, le grand dauphin commun (*Tursiops truncatus*) ainsi que le dauphin long bec (*Stenella longirostris*) font l'objet d'un suivi scientifique depuis 2001. Ces espèces occupent des eaux relativement côtières autour de la Réunion. La méthode de photo-identification est utilisée dans le but de caractériser certains paramètres de ces populations, tels que la fidélité au site, les mouvements, les associations entre individus et l'abondance de la population.

Le nombre de grand dauphins communs résidents estimé dans les eaux réunionnaises est d'environ 300 individus (Globice, données non publiées). Les données de photo-identification concernant cette espèce montrent qu'au moins une partie de la population de grand dauphins communs est résidente autour de la Réunion. Concernant le dauphin long bec, sa population a été estimée à 275 individus (Globice, données non publiées). Concernant les espèces pélagiques, l'abondance des dauphins tachetés pantropicaux par la méthode du distance sampling a été évaluée à 2933 individus autour de La Réunion. Les dauphins d'Electre n'ont quant à eux pas été l'objet d'une estimation d'abondance.

Les données sur ces quatre espèces sont aujourd'hui insuffisantes et la collecte de ces données permettrait d'apporter des éléments pour leur gestion et leur conservation à l'échelle locale.

Les isotopes stables, et notamment ceux du carbone et de l'azote, correspondent à un objet d'étude en pleine expansion dans le domaine de l'écologie, qui se veut complémentaire des méthodes conventionnelles. En effet, l'analyse des isotopes stables permet d'apprécier l'écologie trophique des espèces étudiées (zones de nourrissage, niveau trophique et régime alimentaire), à plus ou moins long terme, en fonction du tissu analysé. L'analyse isotopique de la peau fournit une information sur l'écologie trophique à court terme.

Ce programme de collecte d'échantillons cutanés via la biopsie sur ces espèces a pour objectif la collecte sur trois ans en vue de leur analyse isotopique :

*de 25 échantillons supplémentaires venant compléter les 12 préalablement acquis pour le grand dauphin commun,

*de 15 échantillons supplémentaires venant compléter les 21 préalablement acquis pour le dauphin long bec,

*de 30 échantillons pour le dauphin tacheté pantropical et le dauphin d'Electre.

Le prélèvement cutané sera réalisé par du personnel expérimenté. La photo-identification des individus prélevés permettra d'éviter de biopsier le même individu à 2 reprises. Un suivi focal de l'individu ciblé et du groupe auquel il appartient sera réalisé dans les 15 minutes suivant les opérations (suivi à court terme). Les réactions comportementales individuelles et à l'échelle du groupe seront estimées et notées dans des fiches standardisées.

L'application de la technique d'analyse des isotopes stables permettra dans un premier temps d'appréhender l'écologie trophique de ces espèces à court terme (quelques jours), encore méconnue dans les eaux réunionnaises. Une meilleure connaissance de l'écologie trophique de ces espèces permettra de mettre en lumière les zones fonctionnelles utilisées.

Ce programme s'inscrit dans un projet global visant à la mise en commun des données isotopiques en vue de l'analyse de l'écologie trophique à l'échelle de la communauté des prédateurs de la mégafaune marine permettant ainsi de disposer d'une vision globale sur les relations trophiques au niveau de l'écosystème marin réunionnais. Ces nouvelles données pourront inspirer les recommandations pour la conservation et la gestion raisonnée de ces espèces à l'échelle locale. Ces résultats seront communiqués aux institutions en charge de la gestion des milieux naturels à La Réunion, partenaires du projet.

Les objectifs du projet imposent le prélèvement de biopsie cutanée sur un échantillon de quatre espèces de cétacés dans le but d'appréhender leur écologie trophique, en vue notamment de leur conservation. Aucun autre modèle ne peut être substitué. Le protocole de prélèvement est défini, au préalable, selon les standards internationaux, en respectant le principe des 3 R (Remplacement, réduction, raffinement). De plus, un soin tout particulier est donné à la fixation des points limites.

11699 Le VIH se transmet principalement lors des relations sexuelles et une part importante des nouvelles infections dans le monde ont lieu lors de rapports sexuels anaux. Le tractus intestinal est donc un site impliqué dans les premières étapes de l'entrée du virus dans l'organisme. Le virus traverse la couche superficielle (épithélium) de la muqueuse intestinale par différentes voies (brèches tissulaires ou transcytose) pour atteindre la couche intermédiaire (lamina propria), où résident les cellules cibles du virus : lymphocytes CD4+, macrophages et cellules dendritiques. Notre groupe a récemment montré l'implication active des cellules dendritiques de la lamina propria dans la transmission du VIH par voie muqueuse.

Les objectifs de ce projet sont donc d'élucider les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la transmission intestinale du VIH et le rôle des cellules dendritiques. Les résultats de ce projet permettront d'évaluer de nouvelles stratégies pour prévenir la transmission du VIH. Ce projet sera réalisé en comparant des modèles de transmission *in vitro* et *in vivo*, chez l'homme et chez l'animal. Le modèle animal choisi pour ce projet est le primate non humain (PNH). Le modèle d'infection expérimentale du PNH par des souches pathogènes du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) est particulièrement adapté pour ces études. Le PNH constitue le seul modèle expérimental reproduisant l'infection par le VIH. L'évolution de l'infection est semblable à celle observée chez l'homme. Ce modèle est le plus pertinent pour obtenir des résultats prédictifs et transposables à l'homme.

Le projet prévoit au maximum 21 animaux nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. Hébergés en groupe avant infection puis en modules individuels contigus permettant des interactions sociales visuelles, auditives et olfactives, les animaux sont surveillés quotidiennement. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation mettra en œuvre les traitements appropriés dont les protocoles d'analgésie. Des critères arrêts sont prévus. Les méthodes expérimentales ont été choisies de façon à éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (inoculation virale atraumatique et prélèvements de sang et de fluides muqueux sous anesthésie, limitation des

volumes de sang prélevés). Les échantillons biologiques générés dans ce projet ainsi que les métadonnées associées, seront conservés et partagés avec d'autres laboratoires. Les animaux bénéficieront d'un programme d'enrichissement varié défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

11700 L'insulinome est une tumeur neuroendocrine pancréatique qui est caractérisée par la production et la sécrétion inappropriée et non contrôlée d'insuline entraînant des accidents hypoglycémiques. Son incidence est extrêmement faible (un à deux par million d'habitants). C'est la plus fréquente des tumeurs endocrines du pancréas. Elle survient de façon identique dans les deux sexes et le diagnostic est le plus souvent porté vers l'âge de 50 ans. La tumeur est unique et bénigne dans plus de 90 % des cas ; cependant elle peut exposer à des accidents hypoglycémiques graves.

Son diagnostic en imagerie médicale peut se révéler difficile car c'est le plus souvent une tumeur de petite taille (90% font moins de 2 cm et 30% moins de 1 cm), ce qui pose des problèmes de détection avec les moyens diagnostiques actuels.

Jusqu'à présent, on ne dispose pas d'outil d'imagerie moléculaire très performant dans la localisation des insulinomes. La scintigraphie et la tomographie par émission de positons (TEP) avec des analogues de la somatostatine marquée montrent une sensibilité modérée, principalement en raison d'une expression tumorale variable et souvent trop faible des récepteurs de la somatostatine. La TEP à la 18F-FDOPA a été proposée pour l'imagerie de l'insulinome chez l'adulte avec des résultats discordants. La principale limitation de cette technique est liée à l'absorption intense de ce marqueur par le pancréas et donc un rapport de fixation tumeur/tissu sain non optimal. L'administration de la carbidopa (CD), un inhibiteur compétitif de la dopadécarboxylase, administré avant un examen TEP réduit la fixation pancréatique et améliore donc le signal dans la tumeur. Malgré l'utilité clinique de cette association dans les explorations TEP des tumeurs neuroendocrines, le mécanisme et la cinétique d'action de la carbidopa sur la fixation de la 18F-FDOPA sont partiellement connus et les effets sur les cellules tumorales restent controversés. Une meilleure évaluation des effets inhibiteurs de la carbidopa sur la tumeur permettrait de confirmer cet effet bénéfique. En conséquence, l'objectif principal de ce travail sera d'évaluer l'effet de la prémédication par CD sur la fixation tumorale de la 18F-FDOPA dans un modèle animal d'insulinome analysé *in vivo* par imagerie μ TEP/ μ TDMX. L'imagerie TDMX (rayon X) est une image anatomique qui permet de mieux localiser la tumeur visualisée en imagerie TEP (fusion des 2 modalités d'images obtenues). Ainsi notre travail intègre une dimension translationnelle dont les résultats pourront directement influencer les pratiques cliniques actuelles concernant l'exploration fonctionnelle des insulinomes par TEP à la 18F-FDOPA chez l'adulte.

L'objectif secondaire est l'utilisation d'autres traceurs pour compléter cette étude ciblant le transporteur des acides aminés, le métabolisme du glucose, et la prolifération cellulaire.

Ces traceurs seront finalement tous testés chez le même animal lors d'une étude longitudinale dans un modèle murin d'insulinome chez la souris immunodéficiente. Le modèle utilisé est obtenu en injectant une suspension de cellules RIN-5F (cellules d'îlots de Langherans de rat) en sous cutané.

En fin de protocole, les tumeurs seront prélevées post mortem pour des études métaboliques (étude des métabolites (sucres, acides aminés.) présents dans les cellules et les tissus par Résonance Magnétique Nucléaire)

La règle des 3 R sera respectée. R : raffinement : les animaux seront placés à plusieurs par cages avec des éléments d'enrichissements afin d'améliorer leur bien-être. Les examens d'imagerie et les injections sont réalisés sous anesthésie générale. R : réduction : le nombre d'animaux dans cette étude est de 51 ce qui est le minimum pour pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus le test utilisé est le t-test de Student entre les 2 groupes FDOPA (carbidopa ou non). R remplacement : cette étude portant sur le suivi du développement tumoral par imagerie fonctionnelle *in vivo* elle ne peut être réalisée que chez l'animal vivant

11701 La pharmacocinétique étudie le devenir de la molécule dans l'organisme. Le devenir du médicament selon les doses utilisées et sa voie d'administration sont étudiés chez l'animal : son absorption, sa

distribution par la circulation sanguine, son métabolisme, son élimination. La pharmacodynamie étudie les effets de la molécule sur l'organisme.

Ces effets sont évalués par le suivi des variations de différents paramètres qui peuvent être par exemple biochimiques (changement du taux sanguins d'enzymes hépatiques, du taux de glucose sanguin, modification de la composition des urines.), hématologiques (modifications du taux de globules rouges/blancs.) ou physiologiques (pression artérielle, fréquence cardiaque, respiratoire.).

Les rongeurs sont régulièrement utilisés pour la recherche biomédicale dans les domaines de santé humaine. En tant que sous-traitant de l'industrie pharmaceutique, nous proposons à nos clients de réaliser la phase expérimentale de leurs études. L'enjeu de ce projet est de réaliser des études chez les rongeurs qui consistent à administrer aux animaux une molécule à tester et en pratiquant ensuite des prélèvements sanguins dans le but :

-de suivre la concentration sanguine de la molécule (pharmacocinétique).

-de suivre les effets pharmacodynamiques de la molécule (modification de la glycémie, modifications hématologiques).

Des prélèvements urinaires et des prélèvements de bile par l'intermédiaire de cathéters biliaires pourront également être réalisés afin de suivre l'élimination de la molécule ou des modifications dans leur composition (pharmacodynamie).

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire la diffusion d'un produit dans le sang des animaux ni d'évaluer les effets d'une molécule sur un ou plusieurs paramètres pharmacodynamiques au niveau de l'organisme entier, il est indispensable de recourir à l'animal entier.

Ce projet englobe plusieurs études et pour chacune le nombre d'animaux nécessaire sera calculé, il sera toujours réduit au minimum, en tenant compte de la variabilité des résultats attendus. Une évaluation éthique préalable sera faite pour chaque étude. Le mode d'administration des produits sera fonction du produit à tester mais toujours conforme aux recommandations en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires. Les prélèvements sanguins seront toujours réduits au minimum. Ils pourront être réalisés soit sur animal anesthésié au préalable, par ponction directe, soit vigile, via un cathéter ou par microsampling (technique permettant de faire des prélèvements de volume sanguin très faible et donc permettant de faire légèrement plus de prélèvements sur le même animal et donc de réduire le nombre total d'animaux utilisés. Les animaux seront hébergés en group avec un enrichissement du milieu adapté, à l'exception des animaux ayant un cathéter en place (duodéal, biliaire ou veineux) ou lors de prélèvements d'urine ou de fèces. Une attention particulière sera alors portée au raffinement et à l'enrichissement du milieu pour éviter l'ennui.

Au total, 15 000 rongeurs pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet.

11702 Les thérapies anticancéreuses sont connues pour leurs effets gaméto-toxiques, pouvant entraîner une stérilité définitive. Alors que chez l'adulte on peut proposer de congeler des spermatozoïdes avant d'engager le traitement pour préserver sa fertilité, ce n'est bien entendu pas possible chez l'enfant. La seule mesure de préservation actuellement envisageable pour ces garçons est de procéder à un prélèvement et une cryoconservation de tissu testiculaire, sans garantie que les progrès scientifiques futurs permettront de restaurer leur fertilité dans le cadre d'un projet parental assisté médicalement (PMA). Aucune de ces techniques de restauration de la fertilité n'est actuellement disponible chez l'Homme. Le prélèvement et la conservation du tissu testiculaire chez le garçon prépubère sont autorisés en France. Il existe dans certaines pathologies un risque théorique de présence de cellules malignes au sein du tissu prélevé et conservé. La maturation *ex vivo* présenterait l'avantage d'écartier tout risque de réintroduction de cellules malignes.

Dans ce contexte, l'équipe demandeuse a développé, en collaboration avec des partenaires académiques et privés, un premier prototype de « testicule artificiel » qui a permis pour la première fois de réaliser toute la spermatogenèse chez le rat, la souris, le singe macaque rhesus/cynomolgus et l'Homme *ex vivo*.

L'objectif du projet est d'obtenir des spermatozoïdes qui seront utilisés en fécondation *in vitro* par micro-injection dans l'ovocyte pour l'obtention d'un embryon viable. Il consiste en une biopsie testiculaire sur 1 macaque rhésus prépubère ainsi qu'une collecte d'ovocytes sur 5 femelles macaques rhésus. A partir de ces tissus l'équipe demandeuse pourra réaliser la preuve de concept chez le primate non humain, en particulier chez le macaque, qui est plus proche de l'homme que les rongeurs.

La biopsie testiculaire ne sera effectuée que sur un seul testicule. Chaque biopsie permettra de faire une seule culture pour la maturation *ex vivo* des spermatozoïdes et sera juste suffisante pour une fécondation *in vitro* réalisée plus tard. Le nombre de femelles rhésus impliquées dans le projet est réduit à son maximum afin de pouvoir obtenir des embryons au stade blastocyste (Réduction). Les femelles impliquées sont des femelles reproductrices hébergées dans un élevage : il est donc préférable de réaliser une collecte d'ovocytes par femelle afin de limiter le nombre d'interventions par individu. De plus toutes les procédures seront faites sous anesthésie générale et couverture antalgique afin d'impacter le moins possible les animaux (raffinement). Le remplacement de l'animal n'est ici pas possible, car la seule alternative serait l'utilisation de tissu humain, mais Il est interdit en France de tester le pouvoir fécondant des spermatozoïdes humains obtenus *ex vivo* (remplacement).

11703 La capacité de garder en mémoire une expérience est essentielle pour la survie des organismes supérieurs. Cette capacité est en partie assurée par une structure cérébrale appelée hippocampe. L'hippocampe est divisé en plusieurs sous-régions, connues pour jouer différents rôles. Parmi ces sous-régions, CA3 est impliqué dans la mémoire des événements vécus dans leurs contextes ou mémoire épisodique. Des études ont montré que les oscillations générées par la synchronisation des neurones de l'hippocampe traduisent de l'état comportemental de l'animal et jouent un rôle dans l'encodage et la consolidation de ce type de mémoire. Cependant, le fonctionnement *in vivo* des neurones de CA3, leur relation avec les oscillations hippocampiques, et le rôle joué par les informations reçues depuis le gyrus denté n'ont pas encore été testés. Le projet propose d'étudier (i) le fonctionnement des neurones de CA3 *in vivo* lors de différents états de veille et (ii) le rôle joué par les informations reçues depuis le gyrus denté, à l'aide d'enregistrements de neurones chez la souris éveillée. Il est possible de rendre silencieuse une population de neurones en y faisant s'exprimer des protéines les rendant sensibles à certains composés chimiques. Ces manipulations permettront d'enregistrer la réponse des neurones de CA3 après inhibition des neurones se situant en amont, dans le gyrus denté de l'hippocampe. En corrélant l'activité de ces neurones vis-à-vis des oscillations de l'hippocampe et des comportements de l'animal, nous pouvons élucider le fonctionnement des circuits de CA3 dans un contexte physiologique à l'échelle cellulaire ainsi qu'à l'échelle plus globale du réseau de neurones. Cette étude est la première à étudier l'activité des cellules de CA3 chez l'animal éveillé dans un contexte physiologique. Elle permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires à l'origine de l'encodage et la consolidation de la mémoire.

Dans un premier temps, nous compléterons les données déjà récoltées et analysées au laboratoire concernant l'activité et la dynamique des neurones de CA3 lors de différents états de veille. Les données obtenues montrent une importante modulation de l'activité des neurones en fonction de différents états cérébraux. Nous souhaitons donc compléter ces données et effectuer d'autres mesures qui permettront d'élucider les différents mécanismes cellulaires à l'origine de ces modulations.

Nous souhaitons ensuite étudier le rôle des informations reçues par le gyrus denté au cours de différents états de veille sur l'activité et les modulations précédemment rapportées dans les neurones de CA3. Ces informations ont été proposées comme jouant un rôle dans l'encodage et le rappel efficace de la mémoire. Pour cela nous inhiberons le gyrus denté pendant les enregistrements électrophysiologiques des cellules de CA3.

Ce projet respecte la règle des 3R. Pour le R de remplacer, bien que de nombreuses données existent quant à l'activité des neurones dans des modèles de culture *in vitro*, ce projet se propose d'étudier le fonctionnement des neurones dans un contexte physiologique et intact. Cela nécessite donc d'effectuer les expériences *in vivo* chez l'animal vigile. Pour le R de réduire, nous limitons les

groupes expérimentaux de manière à pouvoir réaliser dans le temps imparti les expériences nécessaires mais également l'analyse de ces dernières qui prend un temps conséquent (1/3 du projet). Sur le temps restant, 340 animaux seront utilisés pour effectuer des mesures électrophysiologiques. L'expertise du laboratoire nous a permis d'établir que malgré la difficulté technique connue de ces expériences, un enregistrement de qualité était obtenu pour 2 animaux sur 3 en moyenne. Pour pouvoir effectuer des analyses statistiques robustes, nous savons qu'environ 20 cellules sont nécessaires/groupe. 130 de ces animaux seront utilisés pour étudier l'impact de l'inhibition du gyrus denté sur l'activité de CA3. Les 210 autres animaux seront utilisés pour compléter l'étude qui a déjà commencé au sein du laboratoire et qui faisait déjà l'objet d'une autorisation de projet concernant l'activité des cellules de CA3 en fonction de différents états de veille et comportementaux.

Pour le R de raffiner, toutes les procédures seront réalisées par une personne formée et ont été optimisées pour soulager le stress et la douleur des animaux tout au long de cette étude. Ainsi, toute chirurgie est réalisée sous anesthésie générale avec contrôle de la température corporelle. Une couverture antalgique permettra une limitation de la douleur pendant et après le réveil de l'animal. Les animaux seront surveillés quotidiennement par l'expérimentateur, du jour de la chirurgie jusqu'à la fin de l'expérimentation. Des points limites sont définis et décrits dans les procédures pour éviter la souffrance des animaux. De plus, un enrichissement des cages constitué de maisons en papier mâché seront utilisés pour permettre aux animaux de se cacher et établir des liens sociaux entre eux.

Ainsi, ce projet nécessite l'utilisation au total de 340 souris sur 3 ans. 130 seront utilisées pour l'inhibition du gyrus denté, et 210 seront utilisées pour l'étude en conditions physiologiques des neurones de CA3 en fonction de différents états comportementaux et de veille. Si cela est possible, le nombre d'animaux sera revu à la baisse, en cours d'expérimentation.

11704 Le pancréas joue un rôle clé dans l'homéostasie nutritionnelle par la synthèse et la sécrétion d'hormones et d'enzymes. Cet organe inclut des cellules endocrines et exocrines. Le pancréas exocrine se compose de cellules acinaires et canalaire, alors que les cellules endocrines sont regroupées en des îlots de Langerhans. Ces derniers correspondent à des micro-organes spécialisés composés de quatre différents types de cellules : alpha, bêta, delta, et PP produisant les hormones glucagon, insuline, somatostatine et PP (polypeptide pancréatique), respectivement. L'insuline et le glucagon fonctionnent de façon coordonnée pour contrôler l'homéostasie du glucose (ou glycémie), alors que la somatostatine et PP régulent la sécrétion d'autres hormones et d'enzymes exocrines.

Comprendre comment les cellules bêta sont générés au cours du développement, mais aussi à l'âge adulte, est une condition préalable à la conception de nouvelles thérapies de régénération cellulaire dans le contexte de la recherche sur les diabètes de type 1 et 2, deux maladies résultantes in fine en la perte ou diminution importante du nombre de cellules bêta. Sans traitement, cette condition peut avoir de graves conséquences telles que des dommages vasculaires, des risques de cécité, d'amputation, ou même la mort. Les traitements actuels consistent en l'injection d'insuline exogène pour compenser la déficience en cette hormone. Cependant, les facteurs environnementaux tels que l'exercice, le régime alimentaire, la grossesse, ou l'âge, peuvent provoquer de fortes variations dans les niveaux de glucose sanguin, malgré un traitement à l'insuline, et donc éventuellement conduire aux complications présentées précédemment. La transplantation d'îlots représente un substitut au traitement à l'insuline mais la pénurie de donneurs empêche son utilisation généralisée.

Ainsi, d'autres alternatives doivent être développés afin de traiter efficacement les conséquences du diabète. Dans ce but, nous avons récemment découvert que les inhibiteurs de BET (protéines de la famille des domaines extracellulaires et du bromodomaine) pourraient moduler le développement des cellules endocrines du pancréas à la fois dans le pancréas foetal et dans des modèles de cellules bêta humaines dérivées de modèles de iPSC. Notre objectif est donc de déterminer comment les inhibiteurs de BET modulent la masse de cellules β fonctionnelles *in vivo*. Plus précisément, nous utiliserons deux inhibiteurs BET disponibles dans le commerce, JQ1 et

iBET-151, que nous testerons dans des souris de type sauvage ainsi que dans l'un de nos modèles transgéniques.

Nous prévoyons d'utiliser 3900 souris pour l'ensemble de ce projet qui répond aux exigences de la règle des 3 R :

Remplacement : les effets métaboliques analysés sur le long terme requièrent un système biologique intégré tel qu'un organisme vivant. Ceci ne peut malheureusement pas être modélisé *in vitro*.

Réduction : Nous utiliserons un nombre d'animaux aussi faible que possible. L'application de tests statistiques nous permettra de réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire à l'obtention de résultats significatifs et exploitables et sans prévoir répétition des expériences.

Raffinement : Aucun des animaux utilisés dans ce projet ne présente de phénotype dommageable. Durant toute la procédure, les animaux seront suivis en s'appuyant sur une grille de score permettant d'évaluer et d'objectiver les éventuelles souffrances, et de mettre en œuvre des points limites précoces et adaptés. En amont de la procédure, des dispositions (habituation) sont prises pour minimiser tout stress aux animaux.

11705 Chez l'Homme, les anévrismes intracrâniens (AIC) sont des malformations vasculaires du cerveau présentes chez 2 à 5% de la population générale. Les anévrismes sont susceptibles de se rompre dans environ 1 % des cas avec beaucoup de variation dans la population. La rupture d'un AIC provoque un Accident Vasculaire Cérébral (AVC) de type hémorragique pour 10/100 000 habitants par an. Plus précisément, la rupture d'un AIC entraîne un saignement comprimant le cerveau, dont les conséquences peuvent être dramatiques. Malgré les progrès thérapeutiques récents, un épisode hémorragique reste létal dans 65 % des cas et cause des séquelles neurologiques graves chez 50 % des survivants. En cas de rupture, des traitements efficaces et durables existent mais restent dépendants de centres spécialisés. On retrouve des thrombi (caillots de sang) dans les sacs anévrismaux dans 25 % des AIC non rompus et dans 75% des AIC rompus suggérant un rôle moteur des plaquettes dans la pathologie. Néanmoins, il n'existe pas aujourd'hui de consensus médical pour le traitement préventif des AIC non rompus, découverts fortuitement, alors même que les progrès techniques de l'imagerie médicale permettent de révéler de plus en plus d'anévrismes intracrâniens.

Chez ces patients porteurs d'anévrismes pourtant parfaitement asymptomatiques cette découverte laisse planer une menace impliquant une décision médicale cohérente et adaptée au risque de chaque patient. Il n'existe pas de traitement préventif non-invasif et les traitements invasifs laissent planer une morbi-mortalité de 3 à 15 % inexplicable. Cette absence d'alternative médicamenteuse provient directement d'un manque de connaissance des mécanismes de formation, de progression, et de rupture des AIC.

L'objectif de ce projet est donc de définir le rôle des plaquettes pendant la formation des AIC et de tester différentes molécules inhibant les plaquettes (anti-plaquettaires) dans un modèle d'AIC chez la souris.

Ces stratégies thérapeutiques nécessitent des études morphologiques non-invasives par Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) ainsi que l'analyse de la pression artérielle de façon non invasive également, au début et à la fin de l'étude, grâce à l'utilisation d'un brassard de queue (expérience de Tail cuff) adapté à la souris après une période d'acclimatation afin d'éviter le stress. A cela s'ajoute une étude histologique des tissus après le sacrifice qui seront corrélés aux résultats d'IRM. La connaissance approfondie qui découlera de ces études nous permettra de tester des substances susceptibles d'interférer favorablement avec l'histoire naturelle de la pathologie. Pour la réalisation de ce projet, nous devons utiliser 200 souris.

Afin d'induire la pathologie, les souris devront subir une chirurgie stéréotaxique ainsi que la pose d'une pompe délivrant de l'angiotensine, une molécule permettant la création d'une hypertension artérielle. Cette chirurgie est réalisée sous anesthésie et analgésie locale et générale dans un autre établissement utilisateur (EU) et la procédure a été autorisée préalablement par le comité d'éthique et le ministère. Pour les procédures associées à cet EU, les souris devront changer d'établissement

et subiront une période d'acclimatation aux locaux durant une semaine afin de réduire leur stress, cela afin de ne pas entraîner d'inconfort pour les animaux, ni d'incohérence dans les résultats. Les animaux passeront l'examen de Taill cuff une première fois en début d'expérience et une seconde fois à la fin. Cette procédure est totalement indolore et doit être réalisée chez l'animal vigile car l'anesthésie influence la pression artérielle. Pour la partie imagerie, les animaux seront anesthésiés afin de réduire l'inconfort lié au bruit de la machine et de la contention et avoir les résultats les plus exploitables possibles. Le temps de l'imagerie est d'environ de 25 minutes. Les IRM seront passées avant la chirurgie afin de recalculer précisément les coordonnées stéréotaxiques et après pour suivre l'évolution de la pathologie et vérifier qu'il n'y est pas d'hémorragie présente. Les animaux seront euthanasiés à la suite des procédures d'IRM si la présence d'une hémorragie est visible ou si les 14 jours après la chirurgie sont écoulés. Les animaux ne seront pas mis à mort à la suite du Taill cuff puisqu'il s'agit d'une procédure de suivi de la pression artérielle durant l'étude.

L'utilisation d'animaux pour cette étude ne peut pas être remplacée puisqu'il n'existe pas de méthodes alternatives pour modéliser le développement de l'AIC (utilisation de la culture cellulaire). Le nombre de souris a été réduit à son maximum grâce à l'utilisation de calculs statistiques permettant de déterminer le nombre minimal d'animaux à utiliser pour avoir des résultats exploitables. De plus, l'imagerie IRM nous permet de suivre le développement de la pathologie, sans mettre fin à l'expérience, réduisant encore le nombre d'animaux utilisés. Enfin, l'hébergement s'adapte au raffinement réglementaire de la directive UE/2010/63 (nombre d'animaux par cage respecté, présence d'enrichissement, animaux toujours en présence de partenaires dans les cages, nourriture *ad libitum*, présence de soins journaliers...) ainsi que les techniques utilisées (réduction du caractère invasif de certaines manipulations comme la prise de pression artérielle au brassard plutôt qu'une pose de cathéter). Tout cela permettant de respecter les 3R.

11706 Chaque année, l'arrêt cardiaque touche en Europe près de 700 000 patients par an et 17 millions de personnes dans le monde. En l'absence de prise en charge efficace précoce, la survie dépasse rarement les 3 %. Une organisation préhospitalière coordonnée et efficace peut permettre jusqu'à 30% de survie. Même lorsqu'une réanimation a pu être mise en place rapidement, la reprise d'une activité cardiaque ne survient pas chez tous les patients. Il est donc proposé de recourir à des traitements complémentaires tels que l'assistance circulatoire extra-corporelle (ACE). Elle permet de maintenir une perfusion des organes vitaux jusqu'à ce que la cause de l'arrêt cardiaque soit identifiée et traitée.

Dans les situations d'arrêt cardiaque réfractaire sous ACE, il peut être nécessaire de maintenir l'administration de vasopresseur dont la Noradrénaline, traitement de référence. L'utilisation de fortes doses de Noradrénaline ainsi que l'absence de réponse favorable peuvent être observées. L'utilisation d'autres agents, tel que la Vasopressine, dans le traitement de ces états de vasodilatation (dilatation des vaisseaux) généralisée pourrait éviter certaines difficultés rencontrées. A notre connaissance, il n'existe pas d'étude comparant Vasopressine et Noradrénaline dans les états de choc rencontré après réanimation d'un arrêt cardiaque réfractaire traité par ACE. Il existe un intérêt du fait de la différence de mécanisme d'action de ces deux molécules sur la vasoréactivité et notion d'études comparatives de Vasopressine et Noradrénaline dans différents états de vasoplégie observant un meilleur bénéfice de l'administration de Vasopressine.

L'objectif de cette étude randomisée et prospective est de tester l'efficacité relative de la Vasopressine versus Noradrénaline afin de standardiser le geste thérapeutique dans le traitement de l'arrêt cardiaque réfractaire sous assistance circulatoire.

Le modèle animal de cochon est utilisé pour sa similitude avérée, en termes d'hémodynamique et de morphologie cardiaque, avec les processus physiologiques rencontrés en clinique. L'adaptation à l'environnement physiologique direct du cœur nous conduit à réaliser cette étude sur un modèle animal où toutes les contraintes seront présentes. De plus, la mise en place d'une double circulation extra-corporelle chez le petit animal est quasiment impossible techniquement (impossibilité de remplacement).

Ce projet utilisera 20 porcs adultes (poids = 50-60kg) permettant ainsi une étude statistiquement exploitable (réduire). Ce modèle est déjà en place dans notre structure permettant de réduire le

nombre d'animaux. L'arrêt cardiaque sera provoqué par une ligature coronaire puis après 30 minutes (mise en place du choc post-réfractaire), une assistance circulatoire sera mise en place et 2 molécules seront testées selon le groupe tiré au sort Noradrénaline ou Vasopressine afin de déterminer leur implication et leur bénéfice. L'ensemble du protocole sera réalisé sous anesthésie générale avec un niveau de sédation comparable à celui utilisé en clinique chirurgicale chez l'homme.

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique, assurent le bien-être de l'animal durant la phase expérimentale et permettent ainsi un raffinement de la méthodologie.

11707 Avec 1,4 millions de nouveaux cas diagnostiqués et 381 000 morts dans le monde en 2016, le cancer de la prostate (CaP) est respectivement au 5ème et 9ème rang des cancers en termes d'incidence et de mortalité tous sexes confondus.

Au stade métastatique, le CaP est considéré comme incurable. Toutefois, grâce à la mise en place de campagnes de dépistage, notamment par dosage du taux de PSA (Prostate Specific Antigen) sérique associé aux biopsies, cette pathologie est détectée à des stades de plus en plus précoces pour lesquels des solutions thérapeutiques efficaces existent. Le traitement consiste alors en une ablation partielle ou totale de la prostate. Bien que la survie à 5 ans des patients soit excellente (>90%), l'émergence de récidives biologiques locales est non négligeable (de 6 à 32% suivant les études). Egalement, face aux risques associés (e.g. incontinence, troubles de l'érection) la question est soulevée quant au bénéfice réel apporté par une telle stratégie thérapeutique pour des patients présentant des formes de cancer à évolution lente. Améliorer la stratification des patients ainsi que limiter les risques de récidives après traitement sont donc des enjeux plus que jamais d'actualité.

Une des pistes de recherche pour répondre à ces défis consiste à développer des outils diagnostics, à même d'évaluer avec précision tant la localisation que le caractère agressif des foyers cancéreux afin d'adapter les protocoles de résection de la prostate. Les avancées récentes dans les domaines de l'imagerie et des nanotechnologies ont vu émerger de nouvelles nanoparticules dédiées à l'imagerie multimodale. Ces nanoparticules permettent de combiner l'imagerie de fluorescence (hautement résolutive mais limitée à des explorations superficielles per-opératoires) à l'imagerie TEP (hautement sensible et quantitative pour le suivi d'une pathologie cancéreuse mais peu résolutive). L'association de ces deux modalités au sein d'une sonde unique permettrait donc d'une part, d'affiner le diagnostic, par un suivi efficace de l'évolution de la pathologie, et d'autre part d'améliorer le guidage et l'efficacité des actes chirurgicaux par une délimitation claire, en temps réel, des zones envahies. Ainsi dans ce projet, nous proposons d'évaluer au niveau préclinique l'intérêt de nanoparticules spécifiquement vectorisées vers les cellules tumorales prostatiques par des ligands du PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen).

Pour cela, le projet visera à :

a/ mettre au point et caractériser des modèles sous-cutanés et orthotopiques de cancer de prostate chez la souris. Pour cela, des lignées de cellules du cancer de la prostate luminescente exprimant (ou non) PSMA seront utilisées afin de suivre de façon non invasive l'évolution de la pathologie en imagerie optique. L'expression de PSMA *in vivo* sera évaluée par imagerie nucléaire.

b/ évaluer la toxicité des nanoparticules et étudier *ex vivo* la biodistribution des nanoparticules suite à leur administration (en intratumoral, intraveineuse ou intrapéritonéal) et ce à différents temps post-injection.

c/ valider *in vivo* l'intérêt des nanoparticules pour l'imagerie du cancer de la prostate. Pour cela, l'imagerie nucléaire et l'imagerie de fluorescence des nanoparticules seront réalisées en présence ou non d'un inhibiteur compétitif de PSMA ou en présence d'androgènes.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3R et est de 494 souris maximum sur 5ans. Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée. Afin de réduire le nombre d'animaux, la cytotoxicité des nanoparticules développées au laboratoire a été évaluée *in vitro* préalablement aux études *in vivo*. Cependant, ces études sur

cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer les effets potentiellement indésirables et/ou la distribution non souhaitée d'un nouvel agent d'imagerie. Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. Le suivi des animaux en imagerie permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'étude, en permettant la caractérisation moléculaire *in vivo* (présence de PSMA) et en permettant à chaque animal d'avoir son propre contrôle lors de l'étude avec un inhibiteur compétitif de PSMA. Ces procédures d'imagerie seront réalisées sur des animaux endormis par anesthésie gazeuse à l'isoflurane (2% ; 80/20 air/O₂). La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification et cabane).

Au final ce projet devrait permettre de 1/valider de nouveaux modèles d'études du cancer de la prostate, 2/valider l'utilisation d'une nouvelle technique d'imagerie pour la visualisation de ce cancer.

11708 Le cerveau est une structure extrêmement complexe de par sa composition, ses connexions cellulaires et ses fonctions pour permettre de contrôler diverses réponses rapides et coordonnées à des variations environnementales.

La santé mentale, est une composante essentielle de la santé qui se traduit par un état de bien-être, une aptitude de l'esprit à fonctionner normalement et répondre de manière appropriée aux stimuli. Cependant, des perturbations dans son fonctionnement peuvent aboutir à des troubles mentaux spécifiques (dépression, schizophrénie, troubles bipolaires). Ou encore du fait de l'allongement de l'espérance de vie, à l'émergence de maladies neurodégénératives caractérisées par un vieillissement prématuré et sélectif des cellules nerveuses (comme par exemple Alzheimer, Parkinson). Ces affections sont nombreuses, touchent des cellules nerveuses variées dans leur mode d'expression et de fonctions et sont très peu comprises avec peu ou pas de thérapie.

L'importance de la régulation des gènes dans la structure du cerveau et ses fonctions commence à émerger. Ce projet vise à déterminer l'expression et la localisation dans le cerveau de régulateurs de l'expression génique. Le niveau d'expression de ces régulateurs sera caractérisé dans le cerveau en condition normale ou stimulée. Des méthodes complémentaires existent pour stimuler le cerveau et consistent à soit stimuler les souris par des environnements enrichis soit les stimuler par un psychostimulant. Pour pouvoir déterminer la localisation et l'expression de régulateurs de l'ADN dans les conditions normales ou stimulées les souris seront utilisées du sevrage jusqu'à l'âge de 2 mois, période où le cerveau répondra le mieux à toutes sollicitations.

Pour ce type d'expérience le modèle murin reste l'unique moyen pour étudier fonctionnellement le cerveau dans son entité. Le nombre de souris a été évalué à 200 pour permettre d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ce nombre a été calculé comme nécessaire et suffisant pour pouvoir valider statistiquement les résultats. Les mêmes groupes témoins serviront de base de comparaison pour les différentes quantités de psychostimulant utilisées. De plus les échantillons prélevés serviront en parallèle à d'autres projets présents au laboratoire.

Le bien-être des animaux sera évalué tout au long de la procédure par observation du comportement des animaux (posture, interaction) et mesure du poids. A noter que d'après la littérature utilisant ces procédures, aucune souffrance particulière n'a été rapportée. Cependant, les animaux seront attentivement surveillés pendant toute la durée de la procédure.

L'expérimentation animale est nécessaire pour regarder l'ensemble des structures du cerveau et des différents types cellulaires en interconnexions et ceux en condition normale ou stimulée pour pouvoir étudier le rôle de gènes sur le plan physiologique et moléculaire.

Ce travail permettra de mieux comprendre l'expression et le rôle de régulateurs géniques dans le maintien de l'homéostasie du cerveau chez la souris. A terme, les données issues de ce travail pourraient permettre d'améliorer la compréhension de pathologies cérébrales et d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

11709 L'état de choc est un état pathologique grave défini comme une insuffisance d'apport en oxygène au niveau des tissus par rapport à leurs besoins.

Le choc hémorragique correspond à une baisse importante du volume sanguin circulant (hémorragie aigue). Il représente une cause importante de mortalité et peut être secondaire à un traumatisme grave ou à une rupture d'un vaisseau par exemple.

La baisse du volume sanguin va entraîner une baisse de la perfusion sanguine des tissus et va mener rapidement à un déficit en oxygène ou hypoxie au niveau de ces tissus et une dysfonction des organes

Cette hypoxie tissulaire va activer des cellules endothéliales qui sont les cellules qui tapissent les vaisseaux sanguins qui ont un rôle de barrière au niveau vasculaire. L'activation de ces cellules va provoquer la libération de nombreux facteurs pro-inflammatoires et de la coagulation (pro ou anti) qui aggravent la défaillance d'organe et l'hémorragie.

Une des conséquences secondaires est l'altération d'un ou plusieurs des éléments constitutifs de cette barrière vasculaire représentés par plusieurs éléments : (i) le glycocalyx, (ii) la cellule endothéliale avec ses jonctions intercellulaires, et (iii) la matrice extracellulaire.

Le glycocalyx est une fine couche composée de sucres et de protéines liée aux lipides et aux protéines de la membrane de la cellule dont la fonction principale est d'assurer l'équilibre dans les interactions entre le contenu des vaisseaux et les cellules endothéliales

Sa dégradation intervient dans un grand nombre de pathologies et notamment au cours du choc hémorragique. Une association significative entre la dégradation du glycocalyx et une augmentation de la perméabilité de la barrière vasculaire a été mise en évidence dans plusieurs travaux expérimentaux. Cependant, la contribution relative du glycocalyx à la perméabilité de la barrière vasculaire est actuellement encore largement débattue.

L'hyperperméabilité vasculaire est délétère par différents mécanismes : (i) les fuites capillaires majorent la baisse du volume sanguin circulant qui se surajoute à l'état pathologique initial, (ii) la réanimation initiale consistant en l'apport important de liquide induit l'accumulation de fluide dans le secteur extracellulaire et crée de l'œdème.

Une meilleure compréhension de la contribution du glycocalyx et des autres éléments constitutifs de la barrière vasculaire, notamment le rôle des jonctions intercellulaires, est essentiel afin de comprendre la séquence des événements conduisant à une fuite vasculaire au cours des états de choc et l'impact des thérapeutiques utilisées dans la réanimation de ceux-ci.

Nous proposons une approche multimodale évaluant la hiérarchisation des dommages des différents composants de la barrière vasculaire au cours des états de choc, en particulier hémorragique.

Nous formulons l'hypothèse qu'il existe une gradation des dommages selon l'intensité, le type et la durée de l'état de choc permettant d'établir une cartographie des lésions et d'administrer les thérapeutiques adaptées à la situation rencontrée. De fait, la dégradation de certains éléments n'engendrerait pas ou peu de modifications de la perméabilité vasculaire, notamment celle du glycocalyx.

Dans le contexte de recherche translationnelle, nous développons un modèle murin d'hémorragie gradée qui permettra l'étude de différents paramètres de la dysfonction endothéliale dans une situation qui correspond plus à la pratique clinique quotidienne au bloc opératoire et en réanimation.

Le développement d'un modèle permettant l'évaluation des différents composants de la barrière endothéliale a pour objectif final d'établir une hiérarchie de l'agression que l'on retrouve lors des opérations chirurgicales ou des traumatismes. Une meilleure compréhension de ces phénomènes au niveau de la barrière vasculaire est un enjeu majeur de la recherche pour la prochaine décennie.

Notre étude portera sur 52 rats qui seront répartis en 2 groupes avec un choc hémorragique à volume contrôlé (20% et 40% de la masse sanguine totale de l'animal). Le sang prélevé sera récupéré en totalité et conservé dans un tube avec un anticoagulant (héparine) en vue d'une retransfusion (phase de réanimation) après 90 minutes. Les composants de la barrière endothéliale seront ensuite étudiés à travers différents paramètres sanguins, immunologiques et histologiques

en particulier le glycocalyx endothélial grâce à la mesure itérative de 2 différents biomarqueurs de dégradation du glycocalyx dans le plasma, SYNDECAN-1 et ENDOCAN (ELISA)

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum garantissant un nombre suffisant d'individus pour une exploitation statistique des résultats (réduction). Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu : briquettes de bois, tunnel), de soins et les méthodes utilisées (anesthésie générale sans reprise de conscience) sont les plus appropriées pour réduire la douleur, le stress ou tout autre dommage intercurrent (raffinement). Nous avons établi des points limites (seuil d'anesthésie le plus bas possible permettant l'absence de réponse nociceptive). Dans ce cas, la douleur ou la détresse de l'animal d'expérimentation seront diminuées grâce à des médicaments spécifiques ou dans les cas extrêmes, l'expérimentation sera arrêtée.

11710 Chaque année dans le monde, on estime à 150 000 le nombre d'enfants atteints de cancers pédiatriques (70 000 en guérissent) dont 20% dans les pays développés. Les cancers pédiatriques ont été les grands bénéficiaires des progrès des thérapies anticancéreuses au cours des dernières décennies. En effet, aujourd'hui, le cancer de l'enfant peut être soigné, dans les pays développés, dans 75 à 80% des cas. En France, 1700 enfants en sont atteints chaque année (1 enfant sur 500) et on estime aujourd'hui que 60 000 personnes ont survécu à un cancer pédiatrique dont environ la moitié concerne les hommes. Cependant, ces thérapies sont connues pour leurs effets gaméto-toxiques, pouvant entraîner une stérilité définitive. Alors que chez l'adulte on peut proposer de congeler des spermatozoïdes avant d'engager le traitement pour préserver sa fertilité, ce n'est bien entendu pas possible chez l'enfant. La seule mesure de préservation actuellement envisageable pour ces garçons est alors de procéder à un prélèvement et une cryoconservation de tissu testiculaire, sans garantie que les progrès scientifiques futurs permettront de restaurer leur fertilité dans le cadre d'un projet parental assisté médicalement (PMA). Aucune de ces techniques de restauration de la fertilité n'est actuellement disponible chez l'Homme. Le prélèvement et la conservation du tissu testiculaire chez le garçon prépubère sont autorisés en France. Il existe dans certaines pathologies un risque théorique de présence de cellules malignes au sein du tissu prélevé et conservé. La maturation *ex vivo* présenterait l'avantage d'écartier tout risque de réintroduction de cellules malignes.

Dans ce contexte, l'équipe demandeuse a développé, en collaboration avec des partenaires académiques et privés, un premier prototype de « testicule artificiel » qui a permis pour la première fois de réaliser toute la spermatogenèse chez le rat, la souris, le singe macaque rhesus/cynomolgus et l'Homme *ex vivo*.

L'objectif du projet global est d'obtenir des spermatozoïdes qui seront utilisés en fécondation *in vitro* par micro-injection dans l'ovocyte (intracellular sperm injection, ICSI) pour l'obtention d'un embryon viable.

Ce projet global se décompose en 5 phases : (i) à partir de biopsie testiculaires réalisées sur des macaques cynomolgus prépubères, production de spermatozoïdes maturés *ex vivo*, (ii) analyse épigénétique comparée des spermatozoïdes maturés *ex vivo* et *in vivo*, (iii) production d'embryons par micro-injection dans des ovocytes de macaques cynomolgus (ICSI), (iv) analyse de la signature transcriptomique et épigénétique, et (v) transfert des embryons dans des femelles porteuses afin de permettre leur développement à terme. Ces cinq étapes sont parfaitement maîtrisées par les différents acteurs du projet avec des spermatozoïdes normaux maturés *in vivo*. Notre défi est d'évaluer les spermatozoïdes maturés *ex vivo* et *in vivo* selon le même paradigme expérimental

Cette demande d'autorisation de projet est une prestation de service et ne concerne que la partie biopsie testiculaire sur 15 macaques cynomolgus prépubères. A partir de ces tissus l'équipe demandeuse pourra réaliser la preuve de concept chez le primate non humain, en particulier chez le macaque, qui est plus proche de l'homme que les rongeurs.

La biopsie testiculaire ne sera effectuée que sur un seul testicule de chaque animal (une seule procédure par animal). Chaque biopsie permettra de faire une seule culture pour la maturation *ex vivo* des spermatozoïdes et sera juste suffisante pour une procédure d'ICSI. La probabilité d'obtenir un embryon viable par ICSI est relativement faible, c'est pourquoi le nombre d'animaux a été réduit

à 15. Même si le risque d'endommager le testicule suite à la biopsie est négligeable, il est préférable de ne réaliser cette procédure que sur un seul des deux testicules afin de préserver la fécondité des animaux utilisés. De plus toute la procédure sera faite sous anesthésie générale et couverture antalgique afin d'impacter le moins possible les animaux (raffinement). Le remplacement de l'animal n'est ici pas possible, car la seule alternative serait l'utilisation de tissu humain, mais Il est interdit en France de tester le pouvoir fécondant des spermatozoïdes humains obtenus *ex vivo* (remplacement).

11711 Chez l'Homme, la consommation d'une nourriture trop riche en gras et en sucre entraîne une accumulation de graisse dans l'organisme, qui est associée à des troubles des capacités métaboliques et à des maladies en découlant, tel que le diabète.

Nous avons identifié un gène d'intérêt dont l'action pourrait s'avérer bénéfique dans le cadre de cette surconsommation de nourriture. Son action pourrait être médiée par la meilleure utilisation d'un composé naturellement présent dans certains aliments.

Nous souhaitons donc étudier en parallèle, l'action du gène en présence ou non de cet élément dans une nourriture enrichie afin de déterminer si un complément alimentaire associé à un traitement pharmacologique sur ce gène, seraient à même de réduire les effets néfastes d'une nourriture trop riche.

Pour cela, nous allons utiliser un modèle animal : la Souris. Celui-ci présente de nombreux avantages pour ce type d'étude. En effet, son utilisation est aisée, nous disposons de tests fonctionnels simples et similaires à ceux de l'Homme (suivi de la glycémie, de la résistance à l'insuline). Par ailleurs, nous pouvons générer des animaux dépourvus du gène d'intérêt et ainsi comprendre le rôle joué par celui-ci.

REMPACEMENT : nous ne pouvons pas utiliser une méthode alternative dans le cadre de ces études, qui nécessitent un organisme complet régulant ses apports et sa dépense énergétique.

REDUCTION : nous prévoyons d'utiliser 90 souris dans cette étude. Cela constitue un nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour pouvoir obtenir des résultats statistiquement interprétables ; en étudiant les différentes modalités (régime enrichi ou non, avec ou sans modification du gène d'intérêt, avec ou sans complément alimentaire).

RAFFINEMENT : Les animaux seront surveillés quotidiennement afin de s'assurer qu'ils ne présentent aucun signe de souffrance ou un mauvais état général lié à l'exposition à un régime enrichi. Les procédures expérimentales utilisées dans ce projet sont très peu invasives et nous ne n'attendons aucun phénotype dommageable chez les animaux génétiquement modifiés, cette lignée étant déjà établie depuis plusieurs années. Une surveillance du poids et de l'état général des animaux sera effectuée de manière hebdomadaire et un protocole de suivi est établi au sein de l'institut qui entraînera l'application de soins vétérinaires si besoin.

11712 Les patients atteints de cancers localisés au niveau du thorax et traités par radiothérapie peuvent développer des séquelles pulmonaires. Les nouveaux appareils de radiothérapie permettent aujourd'hui de conformer de manière très précise les rayonnements au volume de la tumeur, avec une très grande précision dans le cas de l'irradiation en conditions stéréotaxiques, caractérisée par une imagerie de haute qualité de la tumeur, et la convergence de mini-faisceaux en son centre (faisceaux de quelques millimètres), réduisant ainsi drastiquement le volume irradié.

L'irradiation stéréotaxique est modélisée chez la souris au laboratoire depuis plusieurs années, avec un recul sur les lésions générées par l'exposition à différentes doses uniques et fractionnées. En particulier, nous avons observé un important infiltrat inflammatoire riche en macrophages, qui demeurent au sein du tissu jusqu'à 12 mois après irradiation. L'objectif du projet est d'identifier dans les lésions pulmonaires les différents sous-types de macrophages et leur origine (macrophages résidents ou issus de la circulation sanguine).

La première étape d'identification des sous-types de macrophages se fera sur les échantillons déjà disponibles au laboratoire par immunohistochimie. La seconde étape a pour but de déterminer l'origine tissulaire ou circulante des macrophages. Elle se fait via la mise au point du modèle de

parabiose chez la souris (P18-16). La dernière étape consiste à caractériser les différentes populations macrophagiques par cytométrie en flux. L'espèce choisie est la souris, modèle de référence pour les études précliniques.

Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 70 souris.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Toutes les expérimentations se feront sur tissus prélevés après euthanasie de l'animal. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux animaux (enrichissement et hébergement, anesthésie et analgésie).

11713 D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, la pollution de l'air par les particules fines et ultrafines constitue un problème sanitaire majeur. Dans les zones périurbaines, les particules émises dans l'atmosphère ont principalement pour origine l'agriculture, la combustion de matières organiques, les transports. Par ailleurs, la France est le premier consommateur européen en herbicides, fongicides et insecticides. Il a été établi que 98% des insecticides pulvérisés et 95% des herbicides n'atteignent pas les espèces ciblées, 30 à 50% des quantités utilisées étant libérées dans l'atmosphère. La plupart des pesticides sont persistants et sont transportés loin de leur source d'émission sous forme de particules. Si les conséquences de l'intoxication aiguë par des pesticides sont bien connues, les effets à long terme causés par la pollution atmosphérique, plus subtils et nocifs, restent difficiles à évaluer. Des études épidémiologiques récentes ont suggéré un lien potentiel entre l'exposition à des substances telles que les pesticides, les métaux et les échappements de diesel, et les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Ces pathologies, dont la prévalence augmente en raison de l'augmentation de la longévité, présentent des facteurs de risque environnementaux susceptibles de s'ajouter à la composante génétique connue depuis longtemps. De précédentes études menées au Laboratoire utilisant des polluants représentatifs de ceux détectés en région PACA, ont permis de sélectionner deux composés parmi les plus présents dans l'atmosphère (mesures sur site du Laboratoire et source AIRPACA) et potentiellement neurotoxiques. Le Laboratoire a développé un dispositif unique d'exposition imitant l'atmosphère via la production et la nébulisation de particules sèches nanométriques ($\leq 1 \mu\text{m}$) dans une enceinte d'exposition de 43 litres permettant de contenir plusieurs animaux à la fois qui peuvent se mouvoir librement. Les aérosols diffusés dans l'enceinte sont de concentration, d'humidité et de taille en particules constantes sur la période d'exposition choisie, permettant ainsi d'exposer les animaux de manière chronique à des atmosphères pertinentes pour l'environnement (c.-à-d. de l'ordre du ng/m^3). Dans le présent projet, ce savoir-faire sera utilisé pour étudier les liens entre l'exposition aux pesticides, la dysfonction mitochondriale, la carbonylation des protéines et leur incidence sur les maladies neurodégénératives. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 400 souris dont 200 animaux modèles de la maladie d'Alzheimer et 200 animaux sauvages, répartis en 20 groupes, 4 groupes témoins exposés à un flux d'air et 16 groupes d'animaux exposés à des flux de particules ultrafines contenant un des 2 polluants sélectionnés. Nous utiliserons des analyses de variance à une voie (ANOVA 1) suivie, lorsqu'un effet significatif apparaît, d'un test de comparaison multiple (Test de Fisher LSD).

Les souris seront hébergées dans des conditions conventionnelles de température, luminosité et d'hygrométrie dans des cages adaptées par groupe de 8 individus dans des cages de dimensions adéquates. Les animaux auront libre accès à l'eau de boisson et à la nourriture et disposeront d'un environnement enrichi. Une attention particulière sera portée à l'examen clinique de chaque animal avant, durant et après les phases d'exposition afin de détecter tout signe de stress ou de lésions (peau, muqueuses, yeux). A l'issue de ces expositions, les animaux seront soumis à des tests comportementaux pour déterminer leur capacité de mémorisation et leur niveau d'anxiété. Le principe des 3Rs sera respecté : -Remplacement : il n'existe, à l'heure actuelle, aucune méthode de substitution *in vitro* pour étudier l'impact de l'exposition aux pesticides sur les maladies neurodégénératives. Notre modèle (souris 5xFAD) est un modèle de choix de la maladie d'Alzheimer car elle développe des plaques amyloïdes et présente des signes d'inflammation dans le cerveau à un âge précoce s'accompagnant de troubles de la mémoire proches de ceux observés

chez l'être humain. -Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes et pour chaque individu, nous étudierons l'effet du traitement au niveau de plusieurs tissus (cerveau, sang, poumon, cœur, foie, rein, testicule ou ovaire). -Raffinement : Le microenvironnement des animaux est enrichi par des morceaux de plateau à œufs qui sont rongés émiettés et/ou utilisés comme abris. Les animaux seront manipulés tous les jours pour réduire le stress qui pourrait être généré par les tests comportementaux. Aucune souffrance n'est attendue lors des expériences d'exposition, les animaux étant exposés à des atmosphères réalistes en particules, équivalentes aux concentrations atmosphériques auxquelles sont soumis les habitants en région PACA. Enfin, nous nous assurerons que les expérimentations se déroulent dans des conditions optimales de confort, à l'aide d'examen visuels, les animaux étant filmés durant l'ensemble de l'expérimentation.

11714 La nécessité d'évaluer la sécurité des médicaments est apparue suite aux accidents thérapeutiques du début du XXème siècle voire aux tragédies comme ce fut le cas pour la thalidomide.

Dans ce cadre, l'étude de l'index thérapeutique et de l'innocuité d'une molécule est primordiale. Il s'agit de déterminer les doses à administrer afin d'obtenir la concentration sanguine permettant l'effet recherché mais également d'évaluer la dose à laquelle les premiers effets secondaires apparaissent. Ces études sont fréquemment réalisées sur des rongeurs et pourraient être également considérées comme l'équivalent préclinique des études de phase 1 en développement clinique impliquant des volontaires sains.

Dans ce projet nous adressons 3 questions interdépendantes.

- La première interrogation est de savoir comment le composé se comporte vis-à-vis de l'organisme : comment il y entre, à quelle vitesse, combien de temps il reste avant d'être éliminé et où il va. C'est ce qu'on appelle l'étude des paramètres pharmacocinétiques. Pour cela le composé est administré à différentes doses, puis du sang et/ou des organes sont prélevés à différents moments après l'administration. La détermination de la dose de composé dans le sang ou dans chaque organe par analyse chimique permet de calculer les paramètres pharmacocinétiques d'intérêt.

- Ce projet permet également d'évaluer les éventuels effets secondaires d'une molécule lors de son administration aux doses que l'on souhaite utiliser pour traiter la maladie (dose thérapeutique théorique estimée notamment par des études préliminaires). Pour cela, des animaux sains sont traités par le composé à tester et leur comportement est observé pour détecter des effets non souhaités comme des somnolences, des hyperactivités ou de la défaillance de coordination motrice.

- Finalement, ce projet permet de déterminer la fenêtre thérapeutique d'une molécule en déterminant la dose d'apparition des effets indésirables. Ceci est réalisé en administrant un composé à une dose supérieure à la dose thérapeutique et à étudier leur comportement pour détecter des effets non souhaités comme des somnolences, des hyperactivités ou de la défaillance de coordination motrice.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R,

Remplacement : aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. En effet, les processus étudiés impliquent des interactions multiples et complexes. De plus, les effets secondaires sont par nature imprévisibles.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesures sont mises en œuvre notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement adaptées (enrichissement du milieu, maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté), une visite quotidienne, une gestion de la douleur (soin, traitement ou euthanasie en fonction de l'avis de la structure chargée du bien être animale pouvant être assisté par le vétérinaire référent) suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

Réduire : nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 10 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 14 160 souris est envisagée.

11715 Dans les pays développés, le cancer de la vessie est au 4ème rang par sa fréquence chez l'homme et 9ème chez la femme. En France, chaque année, plus de 11 000 nouveaux cas de cancer de la vessie sont diagnostiqués et les statistiques font état de 4500 décès annuels. Le traitement du cancer de la vessie repose aujourd'hui principalement sur la chirurgie (exérèse partielle), une ablation totale de la vessie pouvant être pratiquée en cas de cancer infiltrant. La survie nette à 10 ans des patients atteints d'un cancer de la vessie est de l'ordre de 40%. Les taux de récurrence à 5 ans sont entre 31 et 78 %. Ce qui souligne l'inefficacité des traitements actuels et la nécessité de développer de nouvelles thérapies.

Principalement 2 approches sont utilisées pour mimer les événements biologiques associés aux processus de cancer : une approche *in vitro*, basée sur l'utilisation de lignées cellulaires ou de cellules cancéreuses isolées et des approches *in vivo*, basées sur l'utilisation d'animaux de laboratoire, chez lesquels des tumeurs cancéreuses sont transplantées. Les modèles *in vitro* ne recréent ni la diversité de l'environnement des tumeurs, ni la difficulté pour une molécule testée d'atteindre les cellules cibles. De plus, il est impossible d'étudier le développement métastatique dans ces modèles. Ces limitations rendent donc incontournables le recours à l'expérimentation animale pour tester l'efficacité de nouvelles molécules antitumorales.

L'objectif de cette étude est d'évaluer de nouvelles molécules anticancéreuses dans un modèle orthotopique (dans le tissu d'origine de la tumeur) de cancer de la vessie chez le rat et la souris.

- Modèle chez la souris qui permet d'évaluer notamment des immunothérapies, ces outils étant beaucoup plus développés dans cette espèce.

- Modèle chez le rat qui permet d'évaluer notamment des thérapies pharmacologiques, le rat ayant une pharmacocinétique plus proche de l'homme que la souris.

Le nombre d'animaux nécessaire à cette étude est de 1 750 rats et 750 souris en raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

La croissance tumorale sera suivie au cours du temps (jusqu'à 6 semaines) par imagerie de bioluminescence. L'utilisation de cette technique non-invasive permet d'observer au cours du temps un seul animal simplement anesthésié, là où l'information devait être obtenue par euthanasie et autopsie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux.

De plus, afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement adapté à chaque espèce sera rajouté aux animaux (nestlets, Aspen brick...). En accord avec la règle de raffinement, les procédures de traitements vésicaux seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours, le suivi étant assuré par les zootechniciens certifiés de l'animalerie le week-end.

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

11716 La maladie d'Alzheimer comporte plusieurs dysfonctionnements cellulaires tels que l'hyperphosphorylation ou l'agrégation de petites protéines. Ces protéines sont normalement éliminées par la cellule mais en conditions pathologiques, ces protéines sont présentes en excès, clivées sous plusieurs formes qui peuvent être très toxiques. Le but du projet est d'étudier des enzymes potentiellement responsables de la coupure de ces protéines. Plusieurs études ont pu observer un

impact très délétère de ces formes clivées et notre laboratoire a montré par une approche pharmacologique, qu'un enzyme candidat est capable de cliver ces peptides. Ce projet permettrait de connaître les enzymes responsables de l'aggravation de la maladie et serait une voie thérapeutique pour la santé humaine. Pour respecter les 3Rs, ce projet comporte le remplacement avec les études in-vitro et ex-vivo, le raffinement avec l'utilisation d'analgésique et le suivi des animaux par l'expérimentateur et la réduction avec l'utilisation d'un logiciel statistique simulant le nombre d'animaux requis selon les expériences (transgénique ou non, n= 837 souris). Ces souris seront indispensables pour avoir un système intégrant la maladie d'Alzheimer en présence ou en absence de nos enzymes candidats. Notre projet se compose de trois procédures majeures où l'on injectera une particule virale après la naissance des souris (post-natal, procédure 1), à 3 mois (procédure 2) permettant de réduire la quantité des enzymes candidats dans le cerveau (donc d'inhiber la pathologie) et où l'on administrera des inhibiteurs pharmacologiques (procédure 3). L'ensemble de nos modèles murins (WT,2xTg,3xTg) subiront successivement des tests comportementaux et une mise à mort pour les analyses biochimiques et histologiques à 10-12 mois pour analyser l'effet de notre administration. Le modèle 3xTg développe la pathologie de type symptomatique à partir de 6 mois même si les protéines en excès sont présentes depuis le 3ème mois. En ce qui concerne le modèle 2xTg, cela correspond à une variante des 3xTg avec la présence seulement des mutations sur APP et sur Tau. Ces souris montrent un phénotype moins sévère que les souris 3xTg d'un point de vue comportemental et biochimique. Chaque souris sera préalablement anesthésiée avant sa mise à mort pour éviter toute douleur. Pour être en accord avec la réglementation, l'expérimentateur mettra en oeuvre des actions précoces et adaptées à chaque point limite observé afin de respecter le bien-être animal.

11717 A l'heure actuelle, 80% des nouvelles infections par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) se produisent au cours d'un rapport sexuel, avec une transmission du virus par voie muqueuse. Jusqu'à présent, la majorité des études menées sur les mécanismes de la transmission muqueuse du VIH s'est focalisée sur le rôle des particules virales libres. Or les cellules infectées par le VIH, présentes dans les sécrétions génitales, pourraient également jouer un rôle important dans la transmission de l'infection. L'étude de ce mode alternatif de transmission permettra de mettre au point des méthodes plus efficaces de prévention de l'infection par le VIH, méthodes capables de protéger contre l'infection par le virus libre mais également contre l'infection par les cellules infectées présentes dans le sperme.

Dans un premier temps, nous étudierons donc, chez le primate non humain (PNH), seul modèle animal reproduisant dans son ensemble la physiopathologie de l'infection de l'homme par le VIH, l'origine, la nature et le rôle des cellules du sperme infecté par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) dans la transmission de l'infection par voie vaginale. Dans un second temps, nous constituerons des stocks de globules blancs issus du sperme, du sang et de la rate de PNH infectés par SIV ou par des virus chimères SIV/VIH (SHIV). Ces globules blancs infectés seront caractérisés (phénotype, nombre de cellules infectées, infectiosité *in vivo*). Enfin, dans un dernier temps, ces stocks de globules blancs infectés seront utilisés pour inoculer par voie vaginale des femelles PNH afin d'étudier les mécanismes cellulaires, moléculaires, immunologiques et virologiques mis en jeu lors de la transmission de l'infection par ces cellules infectées. Ce projet inclura au maximum 82 animaux, nés et élevés en captivité et provenant d'élevages agréés. En accord avec la règle des 3R, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les prélèvements de sperme seront réalisés autant que possible sur des animaux mâles appartenant à d'autres projets autorisés. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (prélèvement de sang, de sperme et inoculations virales sous anesthésie). Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en oeuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés en modules individuels contigus permettant des interactions sociales et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

11718 Le choc septique résulte de la réponse inflammatoire excessive de l'organisme à une infection sévère. Il constitue l'une des causes les plus fréquentes d'admission en réanimation et s'accompagne d'une mortalité de l'ordre de 35 à 40%. Cette réponse inflammatoire excessive conduit à une hypotension artérielle profonde et à une défaillance des organes appelée défaillance multiviscérale.

Les cellules endothéliales, qui tapissent tous les vaisseaux sanguins, sont fortement impliquées dans ces processus pathologiques et n'assurent plus leurs fonctions (anticoagulantes, anti-agrégantes et imperméabilité endothéliale) : on parle de dysfonction endothéliale.

Les cellules endothéliales expriment notamment des récepteurs aux interférons. L'étude des molécules impliquées dans la dysfonction endothéliale au cours du choc septique a montré que les voies de signalisation de l'interféron sont activées au sein des cellules endothéliales au cours du choc septique. Ainsi, l'inhibition de l'effet des interférons chez des souris en choc septique a montré une amélioration de leur survie. Cependant l'inhibition totale des interférons chez l'homme est risquée, car peut compromettre les défenses immunitaires, indispensables pour lutter contre l'agent infectieux.

Notre hypothèse est que l'inhibition ciblée sur les cellules endothéliales de l'interféron pourrait minimiser les conséquences délétères de la réponse inflammatoire excessive initiale.

Notre projet de recherche repose sur l'utilisation d'un modèle de choc septique chez des souris génétiquement modifiées, déficientes en récepteur de l'interféron au niveau endothélial. Nous étudierons si cette inhibition ciblée en récepteur de l'interféron est capable de conférer la même protection qu'un déficit total sur modèle animal de choc septique. Nous évaluerons également les voies de signalisation en aval de l'interféron. In fine, notre travail permettra si les interférons constituent une cible thérapeutique d'intérêt au cours du choc septique.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin de limiter l'anxiété, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- les phases douloureuses seront réalisées sur des animaux anesthésiés
- les animaux sont alors replacés dans leur cage d'origine avec des congénères qui ont subi la même opération. La nourriture standard déposée au fond pour faciliter la prise de nutriments et l'hydratation, ainsi que du coton cardé pour permettre aux animaux de se maintenir au chaud.
- des traitements antalgiques seront administrés, incluant des antalgiques
- les expériences sur animaux vigiles auront une durée limitée dans le temps.

Remplacer : Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait que les effets d'un choc septique sur l'ensemble de l'organisme sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. Cependant, l'identification préalable des mécanismes moléculaires probablement impliqués ont été faits à l'aide de méthodes alternatives (modèle de cultures cellulaires stimulées par une endotoxine).

L'ensemble de ces expériences nécessitera au maximum 150 souris.

11719 Nous avons récemment montré dans les plaquettes sanguines que les pompes à calcium remplissaient des réserves intracellulaires de calcium. Ce calcium est mobilisé par un second messenger spécifique et cette mobilisation est nécessaire pour la pleine activation des plaquettes sanguines. Ces travaux suggèrent l'existence d'une boucle d'activation spécifiquement dépendante de ces réserves en calcium. Cette boucle d'activation représente un nouveau mécanisme particulièrement important car aujourd'hui il existe des inhibiteurs plaquettaire très efficaces dont l'utilisation pharmacologique présente des risques de saignement. L'inhibition de cette nouvelle boucle d'activation permettrait une diminution de la fonction plaquettaire sans complètement l'inhiber tout en préservant l'intégrité des récepteurs plaquettaire autorisant une activation normale avec des doses fortes d'activateur.

Nous proposons de caractériser cette voie de signalisation spécifique en étudiant l'implication de deux protéines liées à l'activité du messager permettant la mobilisation du calcium à savoir ; l'enzyme le produisant et la protéine qui forme le canal calcique qui est proposé comme étant sensible à ce messager.

L'existence de modèles murins n'exprimant pas soit l'enzyme productrice, soit la protéine formant le canal, est particulièrement précieux car nous pourrions confirmer l'implication de ces protéines dans la boucle d'activation que nous venons de décrire, en réalisant des expériences similaires à celle que nous avons réalisée avec les plaquettes obtenues chez des animaux n'exprimant pas la pompe à calcium. L'utilisation de modèle murin est aujourd'hui indispensable car les plaquettes sanguines sont des éléments cellulaires très fragiles et dont la conservation est limitée et il n'est pas encore possible de pouvoir les produire *in vitro* en quantité suffisante pour réaliser ces études.

Afin de répondre à la règle des 3 Rs, les animaux sont élevés dans un hébergement agréé, respectant au maximum le bien-être des animaux avec un enrichissement du milieu (morceaux de bois à ronger, filaments de papier kraft pour la nidification), la souffrance sera limitée par le respect des méthodes anesthésiques et analgésique. L'ensemble des expériences seront effectuées par une personne habilitée à expérimenter sur animaux. Enfin le nombre d'animaux nécessaire à l'ensemble de l'étude a été défini pour chaque procédure de façon à avoir une réponse statistiquement analysable tout en limitant l'importance par la réalisation de plusieurs procédures en parallèle quand cela est possible.

Ainsi le nombre total de souris prévus est de 580.

11720 Les anticorps monoclonaux représentent une classe thérapeutique de plus en plus importante dans les domaines de l'oncologie, de l'immuno-oncologie ou de l'immuno-dermatologie. Leur sélectivité par rapport à la cible pharmacologique visée et leur profil toxicologique particulièrement favorable en font des thérapies de choix pour le traitement de certains cancers, tant sur la tumeur primaire que sur ses métastases. Ils peuvent être administrés seuls ou en combinaison avec des agents de chimiothérapie. Ils peuvent également être couplés à des molécules très toxiques, leur servant ainsi de vecteur jusqu'aux cellules cancéreuses qu'elles doivent détruire. Face au service médical rendu par ces biomolécules, tout particulièrement en oncologie, le développement d'anticorps thérapeutiques vis à vis de nouvelles cibles pharmacologiques d'intérêt contribue à des solutions d'avenir.

Le présent projet concerne la production par des souris ou des rats, d'anticorps monoclonaux à visée thérapeutique, ou d'anticorps polyclonaux à des fins de dosages. Après plusieurs injections d'un immunogène de choix, les animaux développent une réponse immunitaire classique, monitorée dans le temps jusqu'à atteinte du niveau requis. En fonction du type d'anticorps à produire, le sérum ou les organes lymphoïdes sont prélevés à la fin du protocole d'immunisation, après euthanasie des animaux.

Même si la construction de banques combinatoires de fragments d'anticorps est possible *in vitro*, elle ne permet pas de remplacer totalement l'utilisation de l'animal pour l'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre des immunogènes complexes. Cependant, l'utilisation de ces techniques *in vitro* permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires, les modèles *in vivo* n'étant mis en oeuvre que s'ils sont indispensables. Le suivi dans le temps de la réponse immunitaire est un autre moyen de réduction du nombre d'animaux puisque ces derniers ne seront prélevés qu'au moment le plus opportun, lorsque la production d'anticorps est maximale. Enfin, des mesures de raffinement sont mises en place au travers de l'utilisation d'analgésiques juste avant les immunisations (ex : buprénorphine), d'une anesthésie volatile lors des immunisations et ponctions sanguines et d'un enrichissement du milieu (matériel de nidification, bâtons à ronger, igloo) tout au long de la procédure.

Sur la base de 20 antigènes d'intérêt par an administrés chacun à 4 souris ou 2 rats, un effectif maximal de 600 animaux (400 souris et 200 rats) sur 5 ans est nécessaire pour la conduite de ce projet.

11721 Etat des lieux : Le diabète de type 2 (DT2), problème majeur de santé publique, conduit à un vieillissement précoce de l'ensemble des grandes fonctions (rénale, cognitif, vasculaire). Aujourd'hui la compréhension des mécanismes qui conduisent au diabète et à ces complications notamment vasculaires, est loin d'être élucidée. De plus le panel des traitements prescrits ont pour but de limiter l'aggravation de la pathologie et ne sont pas curatifs. Cette constatation vient du fait que le diabète et ses complications sont multifactorielles et multi-tissulaires. L'identification des mécanismes moléculaires inter-tissulaires et de nouvelles cibles thérapeutiques est fondamentale. L'élastine est un composant structural majeur de la matrice extracellulaire et joue un rôle fondamental dans l'élasticité de nombreux tissus tels que les vaisseaux sanguins contribuant ainsi à la régulation de la pression artérielle. Au cours du vieillissement physiologique, l'élastine se dégrade et n'est pas synthétisée de novo provoquant ainsi une rigidification des artères. Ceci augmente les risques de développement de maladies cardio-vasculaires comme l'hypertension ou l'athérosclérose. Le remodelage matriciel associé à l'inflammation et au vieillissement met en jeu de nombreuses protéases dont les élastases, capables de dégrader et de solubiliser les fibres d'élastine en peptides d'élastine (PE). Ces PE modulent l'activité de nombreux types cellulaires et peuvent conduire à des effets bénéfiques ou délétères en fonction du contexte cellulaire. La dégradation de l'élastine et formation de PE seraient l'un des facteurs impliqués dans le développement du diabète de type 2 et de ces complications vasculaires. Cependant, le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) responsable(s) de ces effets *in vitro* et *in vivo* restent à élucider.

L'objectif du projet : Déterminer 1- l'impact de l'accumulation de PE sur l'évolution du diabète et ses complications vasculaires. 2- les conséquences de l'inhibition de ces PE et du récepteur associé sur la fonction vasculaire. Pour se faire, l'approche intégrée, tenant compte de la communication intercellulaire et intertissulaire est indispensable afin d'avoir un spectre large de l'action des molécules utilisées. L'approche *in vitro*, nous limitera à un type cellulaire et aux facteurs synthétisés voire sécrétés par celui-ci et ne nous renseignera pas sur la communication intertissulaire. De plus les approches *in silico* ou *in vitro* ne permettent pas encore à avoir accès à la fonction tissulaire (ex dilatation ou contraction du vaisseau en fonction du stimulus étudié).

Méthodologie : Des injections (i.v.) répétées de PE seront réalisées chez des souris males C57BL/6 jeune afin de mimer la dégradation de l'élastine et l'accumulation de PE observé chez des sujets vieillissants. Nous testerons également des molécules inhibitrices de l'action de ces peptides afin de tenter de réverser le phénotype induit par ces PE (à noter que les substances injectées ont fait l'objet d'une ou plusieurs études *in vitro*, afin de déterminer les concentrations efficaces et non toxique). Une évaluation du degré d'insulino-résistance et son impact sur la fonction vasculaire sera réalisée. Des tests évaluant la régulation de l'homéostasie du glucose et de la fonction vasculaire (non invasifs) seront effectués chez l'animal vigile afin d'être au plus proche des conditions physiopathologiques. D'autres approches se feront *in situ* (post-mortem) afin d'appréhender et optimiser au mieux les mécanismes moléculaires impliqués et de réduire les approches expérimentales. Afin de réduire le nombre d'animaux, plusieurs procédures seront réalisées sur les mêmes animaux, de façon séquentielle et planifiée. Des temps de latence entre chaque étape de procédures, seront nécessaires pour 1- le bien-être animal 2- pour permettre de rationaliser les résultats de chaque procédure entre eux. Enfin toujours dans le but de réduire le nombre d'animaux, de nombreuses méthodologies seront réalisées post-mortem à partir d'un même tissu (biochimie, microscopie, biologie moléculaire...), quand le protocole expérimental est possible. De plus une étude statistique préalable a été réalisé selon les recommandations liés au bien-être animal. Ainsi 480 souris réparties en 12 groupes (conditions expérimentales), soit 40 par groupes (nécessaire à l'étude statistique finale) seront utilisés dans 1 procédure expérimentale incluant chacune, 6 étapes méthodologiques. Durant le déroulé du protocole, les animaux seront placés dans un milieu enrichi et en présence de plusieurs congénères. Sur les 6 étapes méthodologiques, 3 sont non-invasives, 2 sont des procédures légères, 1 est de niveau modérée et enfin le dernier conduit à une mise à mort. Afin de limiter le stress et l'anxiété lors de ces procédures, une habituation à la contention et aux matériels est prévue une semaine avant et est poursuivi jusqu'au jour de la procédure.

Conclusion : Le DT2 et ses principales complications, au premier rang desquelles les maladies cardio-vasculaires, représentent un problème majeur de santé publique dans le monde. Ainsi,

l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques capables de prévenir ces pathologies est primordiale afin d'envisager de nouvelles thérapies plus efficaces.

11722 Les composés per- et polyfluorés (PFAS) sont employés dans de très nombreuses applications d'usage courant (traitements anti-tâche, imperméabilisation de cuirs ou de textiles, revêtements anti-adhésifs, mousses extinctrices ...) ou dans l'industrie (fabrication de polymères) qui exploitent leurs caractéristiques physico-chimiques exceptionnelles. Le corollaire de ces usages multiples est une exposition généralisée des milieux, notamment aquatiques. Les mêmes propriétés physico-chimiques induisent un devenir dans l'environnement échappant aux outils prédictifs courants, alors qu'il est largement reconnu que certains de ces composés sont persistants et bioaccumulables. Cependant, les études mécanistiques sont encore rares, en particulier chez les vertébrés aquatiques, tandis que les PFAS utilisés par l'industrie évoluent rapidement. Il paraît donc urgent d'améliorer les connaissances liées à cette problématique.

Le projet se développera autour de l'acquisition de données expérimentales sur la distribution interne de trois composés perfluorés modèles chez une espèce de poisson (truite arc en ciel – *Oncorhynchus mykiss*), et l'utilisation de ces données expérimentales pour le développement d'un modèle toxicocinétique à base physiologique, adapté à partir de modèles existants. Cette démarche impose donc d'euthanasier les truites puisque les analyses sont pratiquées sur différents tissus (règle des 3R : substitution : non applicable). L'expérimentation visée impliquera 200 truites, nombre ajusté pour assurer la robustesse statistique des cinétiques obtenues (règle des 3R : réduction). La contamination des truites se fera via la nourriture, à des concentrations réputées non toxiques ; la surveillance quotidienne des bassins permettra d'assurer un déroulement de l'expérimentation en minimisant la souffrance des truites (règle des 3R : raffinement).

11723 L'hémophilie B est une maladie hémorragique héréditaire. La principale complication clinique est l'atteinte articulaire, causée par la répétition des saignements intra-articulaires (hémarthrose). Le traitement est basé sur la perfusion intraveineuse de facteur de la coagulation manquant (le facteur IX). La prophylaxie par des injections régulières de concentrés de facteur IX, ayant comme objectif d'améliorer le taux de facteur anti-hémophilique circulant, est le seul traitement qui a fait ses preuves pour préserver les articulations et réduire le risque de saignement mettant le pronostic vital en danger.

La demi-vie des concentrés de facteur IX étant d'environ 20 heures, une prophylaxie efficace des accidents hémorragiques nécessite 2 à 3 injections intraveineuses par semaine. C'est pourquoi le développement de molécules à action prolongée est un enjeu médico-économique majeur afin d'améliorer la qualité de vie des patients, leur adhésion au traitement et dans un but d'épargne du capital veineux du patient.

Nous avons récemment développé une nouvelle molécule de facteur IX à demi-vie prolongée.

Objectifs scientifiques et/ou perspectives d'application médicale :

Le projet actuel a comme objectif de comparer l'efficacité de la nouvelle molécule de Facteur IX à demi-vie prolongée (FIX-FXIIIB) avec le facteur IX classique chez des souris hémophiles B.

Le projet prévoit 24 souris hémophiles B.

Il est important de préciser que la souris hémophile, paradoxalement à la forme humaine de cette altération génétique, n'est pas victimes de saignement spontané et tout saignement provoqué sur la souris hémophile est résolutif sans prise en charge particulière.

Afin d'obtenir des résultats les plus fiables possibles, ce projet répond aux mieux aux critères de remplacement, de réduction et de raffinement :

1) Remplacement : la souris est un modèle éprouvé, fiable et de nombreuses lignées hémophiles A et B sont disponibles

2) Réduction : le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit à son minimum sans compromettre la significativité statistique de l'expérimentation

3) Raffinement : toutes les mesures seront prises pour préserver le bien-être de l'animal. Les conditions de l'élevage, de l'hébergement, des soins et des méthodes utilisées pour chaque étape de l'expérimentation se feront sous condition de minimiser douleurs, souffrance, angoisse et dommages durables que pourraient ressentir l'animal.

L'ensemble de la procédure sera réalisé sous anesthésie générale, sans réveil.

Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal et à l'observation des signes cliniques fondamentaux, notamment dans le domaine de la coagulation. Toutes les personnes intervenant dans ce projet auront été préalablement formées à ce genre de protocole.

11724 Le but général des études menées dans le cadre de ce programme de recherche à long-terme est de mieux comprendre d'un point de vue fondamental les réponses comportementales, physiologiques et moléculaires du manchot royal face à différents challenges environnementaux. Ceci est particulièrement important dans le cadre des changements globaux tels que nous les connaissons actuellement pour comprendre/prédire les réponses futures des populations, mais également pour identifier des mécanismes spécifiques de résilience aux stress environnementaux pouvant mener à des avancées transposables à la santé animale et humaine.

Pour réaliser ce projet, nous allons étudier chez le manchot royal le rôle de la corticostérone (une des hormones médiatrices des réponses physiologiques et comportementales aux changements de l'environnement) sur la survie des poussins au cours de l'hiver, mais également sur la compétitivité des adultes au sein de la colonie et leur succès reproducteur. Comme cette hormone est transférée à l'embryon en développement (par le jaune d'œuf) pour le préparer à son environnement futur, nous allons explorer la possibilité de prélever une fraction minimale de jaune d'œuf sans compromettre le développement de l'embryon, mais également de moduler de manière exogène la concentration en corticostérone dans l'œuf pour en comprendre les conséquences fonctionnelles sur le potentiel adaptatif des individus. Nous allons également procéder à un suivi multi-années du succès reproducteur en relation avec la qualité des individus adultes (évaluée par la mesure de leurs ornements sexuels colorés et le fonctionnement de leurs mitochondries notamment) et les conditions environnementales, afin de mieux comprendre les déterminants du succès reproducteur chez cette espèce. Enfin, comme les changements environnementaux à venir vont très probablement modifier l'effort de recherche alimentaire en mer, nous allons examiner les conséquences d'un effort accru en mer sur les performances des individus à terre, mais également les conséquences de l'état nutritionnel des individus quand ils quittent la colonie sur leur stratégie de recherche alimentaire en mer.

Sur 5 ans, au total 1170 animaux seront manipulés. Ceci correspond à 280 adultes, 50 poussins et 30 œufs au cœur des expérimentations. A ce total s'ajouteront 460 adultes et 350 poussins qui ne subiront que des manipulations très légères (prises de sang, mesure morphologiques et suivi de survie/succès reproducteur au maximum). Les œufs utilisés proviendront de reproducteurs tardifs (à faible succès de reproduction) seront utilisés pour explorer la possibilité de prélever/injecter dans le jaune d'œuf sans compromettre le développement de l'embryon. Dans nos protocoles, nous cherchons à intégrer au mieux la règle des 3Rs. Par exemple, nous réalisons la majorité de nos expériences sur deux saisons pour nous permettre de Réduire (le plus souvent à la baisse) le nombre d'animaux manipulés la deuxième saison en fonction des résultats obtenus durant la première. Nous mutualisons également nos études avec d'autres programmes scientifiques dès que cela est possible, et nous cherchons à répondre à plusieurs problématiques en n'utilisant qu'un groupe d'oiseaux toujours dans cette optique de Réduire le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs, les effectifs animaux sont choisis à minima au regard d'analyses statistiques permettant de caractériser la variation naturelle observée. Ceci comprend notamment l'étude de l'attribution de variance à travers de modèles statistiques complexes (Modèles Linéaires Mixtes Généralisés (GLMMs), Analyses en Composantes Principales (ACPs), Equations d'Estimations Généralisées (GEEs).

En termes de Raffinement, nous avons développé une méthodologie d'étude du fonctionnement mitochondrial visant à remplacer les biopsies musculaires par l'analyse des cellules sanguines, ce qui limite considérablement le côté invasif des expérimentations. Les interventions sur les animaux

se limitent en fait à des captures, pesées, mensurations, prises de sang à la veine alaire, pose d'implants sous cutanés et de biologgers. Le temps de manipulation est qui plus est réduit au minimum grâce notamment à l'intervention de chercheurs confirmés et formés à manipuler des manchots royaux. Durant les manipulations les animaux ont de plus les yeux couverts d'une cagoule opaque qui limite leur stress. Pour la pose d'implants sous-cutanés, une anesthésie locale ainsi qu'une prophylaxie antibiotique sont mises en œuvre pour réduire au maximum l'inconfort qui pourrait être perçu par les animaux. Ces actes chirurgicaux (implants sous-cutanés et administration des anesthésiques et antibiotiques) sont effectués par un vétérinaire, spécifiquement recruté pour ce programme de recherche. Les biologgers utilisés sont fixés (de manière non permanente) en externe sur les plumes dorsales, ce qui n'entraîne pas de souffrance chez l'animal. Les modèles que nous déployons sont utilisés en routine avec succès chez cette espèce depuis plusieurs années, sans effets négatifs sur la reproduction et la survie. Nous tenons aussi compte au mieux des caractéristiques de la biologie de ces oiseaux (utilisation de reproducteurs tardifs ou précoces selon les types d'expérimentations. Les jeûnes que subissent les animaux durant certaines de nos expérimentations sont de même intensité que ceux auxquels ils ont à faire face naturellement durant la reproduction notamment, ces jeûnes sont en fait une part intégrante de leur cycle biologique. Par ailleurs, nous avons fixé le point limite d'arrêt des manipulations à l'apparition de polypnée (indice du stress de l'animal). Enfin, si dans ce type d'étude il n'est pas possible de Remplacer littéralement les modèles animaux, nous avons pris soin de choisir une espèce animale qui est certes emblématique, mais qui présente des effectifs importants et croissants (classée non vulnérable par l'IUCN), et qui présente une bonne tolérance au dérangement humain. De plus, nous limitons nos expériences à une seule des nombreuses colonies de l'archipel Crozet, qui ne représente qu'une faible proportion (environ 5%) des individus se reproduisant dans l'archipel.

Ces expérimentations permettront de cerner les capacités physiologiques et comportementales d'adaptation de ces animaux aux contraintes de l'environnement, un point clé dans la compréhension des réponses populationnelles au changement global (climat, dérangement humain, etc.).

11725 Le virus Machupo (MACV) est l'agent étiologique de la fièvre hémorragique bolivienne, semblable à la fièvre de Lassa induite par le virus Lassa en Afrique de l'Ouest. Identifié en 1959, MACV a été à l'origine de plusieurs épidémies dans les années 70, causant 25 à 35% de mortalité. Après une trentaine d'années sans émergence signalée, MACV cause depuis 2005 des épidémies récurrentes en Bolivie. Bien qu'étant un problème de santé publique majeur en Amérique du Sud, il n'existe à ce jour aucun vaccin pour prévenir les infections à MACV et aucun traitement complètement efficace. Le développement de vaccin a notamment été ralenti par le manque de connaissances sur ce pathogène de classe 4. Le projet de recherche translationnelle proposé ici se concentre sur une meilleure compréhension des infections à arénavirus et sur le développement de contre-mesures. En ce sens, un vecteur Mopeia (MOPV) recombinant super-atténué exprimant des antigènes du virus Machupo sera utilisé. L'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité du vecteur ont déjà été démontrées chez le singe cynomolgus dans le cadre d'un essai vaccinal précédent contre la fièvre de Lassa.

Le but de ce projet, financé pour 2 ans, est de démontrer que le vaccin peut protéger le singe cynomolgus contre l'infection par le virus MACV tout en respectant la règle des 3R (remplacement, raffinement et réduction). Il est important de noter que les singes cynomolgus sont les seuls modèles appropriés pour étudier les fièvres hémorragiques à arénavirus, les rongeurs étant naturellement résistant à l'infection. Dans un premier temps, des expérimentations *in vitro* ont été réalisées sur cellules primaires immunitaires afin d'éprouver le potentiel immunogène de la construction vaccinale. La capacité à induire une importante réponse immune a été confirmée *in vitro*. Afin de confirmer l'efficacité du vaccin, un essai chez l'animal est indispensable.

Un total de 11 singes cynomolgus sera utilisé, répartis en 3 groupes. Cet effectif est le minimum pour obtenir des résultats statistiquement exploitables (Log Rank test). Le groupe 1 sera composé de 3 singes non vaccinés et infectés par MACV, le groupe 2 de 4 singes recevant une injection unique du vaccin puis infectés par MACV, le groupe 3 de 4 singes recevant 2 injections du vaccin

puis infectés par MACV. Le suivi clinique sera réalisé quotidiennement par un personnel formé et expérimenté. Les singes seront équipés du système d'implants EMKA permettant d'avoir en temps réel le suivi de température, d'activité ainsi que d'autres paramètres vitaux (pression artérielle, fréquence cardiaque et respiratoire.). Ces mesures seront très utiles pour valider l'efficacité du vaccin (et son innocuité après l'immunisation), puisque la fièvre est le signe clinique le plus évident à objectiver chez le singe infecté par le virus Machupo, mais aussi pour monitorer les points terminaux chez les singes qui développeront une maladie sévère (tachycardie, hypotension, hypothermie, tachypnée). Les animaux ne seront pas manipulés vigiles, uniquement sous anesthésies lors desquelles les prises de poids, de température et les prélèvements de sang seront réalisées (une attention particulière sera portée lors des prélèvements de sang afin d'éviter la formation d'hématome grâce à de longs points de compression et la pose d'une pommade anti-oedémateuse locale). Un vétérinaire sera d'astreinte pendant la durée de l'expérimentation et interviendra si nécessaire. Une attention sera également portée sur l'enrichissement alimentaire, de confort et de stimulation. Les résultats obtenus précédemment sur ce modèle nous permettent d'anticiper la dégradation de l'état de santé des animaux et de prendre les mesures nécessaires pour réduire l'état de souffrance des animaux dès que le point limite est atteint. L'infection après vaccination ne devrait pas avoir d'effet néfaste chez les animaux. Seuls les contrôles présenteront des effets néfastes sévères, notamment des changements de température corporelle, une perte de poids, une baisse de l'alimentation et de l'hydratation ainsi qu'une baisse de tonus. Les animaux atteignant le point limite au niveau du score clinique ou atteignant le terme de l'expérimentation seront anesthésiés puis euthanasiés afin de procéder à une nécropsie avec collecte d'échantillons.

11726 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont occasionnés dans 80% du temps par l'obstruction d'une artère cérébrale et dans 30% des cas, de l'artère cérébrale moyenne, entraînant des pertes neuronales irréversibles et conduisant, de ce fait, à la paralysie, voire la mort du sujet. L'ischémie cérébrale est l'une des premières causes de mortalité dans le monde. Cependant son traitement repose essentiellement, pour le moment, sur la thrombolyse (rtPA, Actilyse) dont la fenêtre thérapeutique est assez limitée en raison des risques de neurotoxicité et d'hémorragie.

Partant de ces données, il est nécessaire de trouver de nouvelles approches de traitements présentant une fenêtre thérapeutique accrue et une action plus large pour bloquer plusieurs mécanismes responsables des dommages liés à l'ischémie cérébrale, tels que le stress oxydatif, l'apoptose, l'excitotoxicité et l'inflammation.

Parmi les molécules répondant à ces critères, le PACAP (polypeptide activant l'adénylate cyclase) semble très prometteur. En effet, naturellement produit par l'organisme, le PACAP agit en tant qu'agent neurotrophique et neuroprotecteur, diminuant le volume de l'infarctus, en inhibant les différents processus l'accompagnant (le stress oxydatif, l'apoptose, l'inflammation...). Néanmoins, plusieurs points restent à évaluer et/ou à améliorer pour pouvoir envisager l'utilisation du PACAP en clinique. En effet, ce peptide, rapidement dégradé par l'enzyme dipeptidyl peptidase-4, intervient dans une multitude de processus biologiques, aussi bien au niveau du cerveau que des organes périphériques, activant 3 récepteurs différents (PAC1, VPAC1 et VPAC2) pour exercer ses fonctions de neurohormone, d'agent neuroprotecteur et de neuromodulateur. De ce fait, la mise au point de méthodes d'administration ciblées et le développement d'analogues plus stables et sélectifs est nécessaire pour une utilisation thérapeutique.

Dans ce projet, et grâce à l'utilisation du modèle animal et à la compréhension des mécanismes neuroprotecteurs du PACAP, nous allons participer à l'élaboration d'un traitement alternatif à la thrombolyse qui favorisera la récupération fonctionnelle suite à une ischémie cérébrale.

Dans un premier temps, nous allons évaluer, chez des souris ischémiées, la capacité d'une administration intranasale du PACAP et de deux analogues spécifiques pour les récepteurs PAC1 et VPAC1 à améliorer la récupération fonctionnelle et rechercher les éventuels effets indésirables. Ce volet de l'étude nous permettra également de déterminer les mécanismes d'action et le récepteur impliqué dans les effets neuroprotecteurs du PACAP et ses analogues.

Enfin pour envisager d'utiliser le PACAP comme agent thérapeutique de façon détournée, nous allons étudier l'action neuroprotectrice des gliptines, des inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4

(DPP-4), utilisées dans le traitement du diabète. Sachant que la DPP-4 est responsable de la dégradation rapide du PACAP38 et que l'administration des gliptines réduit les effets d'une ischémie, nous allons rechercher à l'aide de souris SWISS transgéniques PACAP Knock-out, si l'effet neuroprotecteur des gliptines est PACAP-dépendant ou implique d'autres mécanismes.

L'ensemble de ce travail, nous permettra de participer à la mise au point de nouvelles perspectives de traitement des AVCs. Le projet utilisera un total de 584 souris. Afin de respecter la règle des 3R et limiter le nombre d'animaux utilisés, nous ne testerons que des molécules ayant déjà montré leur efficacité *in vitro*. Pour le bien-être des animaux, ils seront maintenus en groupe dans des cages avec environnement enrichi jusqu'aux expériences. Pour limiter l'angoisse des animaux, toute la partie opératoire se fera sous anesthésie gazeuse. De plus, pour limiter la souffrance des animaux, pendant leur opération, une crème ophtalmique sera appliquée sur les yeux pour éviter tout dessèchement et une solution d'atropine sera injectée pour prévenir l'encombrement des voies aériennes. Egalement, de la Xylocaïne sous forme de crème sera appliquée pendant et après l'opération pour limiter la douleur. Enfin, après l'opération, les animaux seront réhydratés pour améliorer leur bien-être et pour faciliter leur alimentation, des granulés ramollis seront placés au fond de leur cage en plus de la nourriture habituelle.

11727 La filière de production cunicole souffre depuis plusieurs années d'une consommation de viande de lapin qui diminue. Elle doit aussi faire face à des critiques fortes sur le mode de logement en cages grillagées et en bâtiment confiné. Le présent projet a pour objectif de proposer des innovations concernant le logement permettant de mieux respecter le bien-être des lapins. Ce projet utilisera une démarche participative qui consiste à impliquer des acteurs de la société civile dans le processus de recherche pour garantir que les connaissances et les applications proposées soient conformes à leurs besoins et/ou avis. Nous incluons dans le présent projet des représentants de la filière de production de lapins : amont (éleveurs, sélectionneurs, firmes d'aliment, équipementier, vétérinaires...) et aval (abatteurs, distributeurs), des consommateurs et des ONG engagés dans la défense de la cause animale.

Le projet consiste à imaginer et tester différentes modalités de logement ou de conduite qui permettent d'améliorer le bien-être des lapins en élevage. Nous utiliserons pour cela un troupeau de 40 femelles reproductrices et leurs descendances qui seront suivies pendant 4 ans (10 080 lapereaux produits au total). Ce troupeau sera renouvelé au fur et à mesure des besoins pour maintenir cet effectif constant.

Tout au long du projet, la moitié des animaux maximum formera un groupe témoin dans lequel les animaux seront conduits et logés selon les pratiques actuelles de production des lapins de chair (cages grillagées sans enrichissement, individuelles pour les lapines et avec densité forte pour les lapereaux). Le restant des animaux formera le groupe expérimental sur lesquels nous testerons les innovations. Ces innovations porteront sur l'enrichissement du milieu (ajout de mezzanine, de terrier, de matériaux à ronger ou à gratter...), la taille du logement (plus grands et plus hauts), la taille du groupe (logement partiellement collectif pour les femelles ; plus grands effectifs pour les lapereaux), la nature du sol (caillebotis plastique ou sol plein avec litière ou parcours extérieur).

Les principales contraintes imposées aux animaux concernent i) le logement des animaux (soit en conditions commerciales en cages grillagées de surface réduite et sans enrichissement, ou en logement semi plein air avec accès extérieur) ii) la manipulation individuelle hebdomadaire pour un marquage de couleur sur le dos dans le but de réaliser des observations comportementales, et iii) une prise de poils par rasage à la fin du cycle de production. Le principe de réduction concerne le nombre de femelles pour avoir des données exploitables d'un point de vue statistique (ici 40 lapines qui vont générer 10 080 lapereaux soit 10 120 lapins totaux). Le principe de raffinement concerne la manipulation bienveillante et expérimentée ainsi que la surveillance permanente de l'état de santé des animaux. Le principe de remplacement concerne l'évaluation du stress des animaux par dosage du cortisol dans les poils à la fin du cycle de production, qui implique un rasage unique (évaluation du stress cumulé), plutôt que par dosage sanguin qui implique de multiples prises de sang. Le remplacement total (absence d'animaux) n'est pas possible puisque la finalité du projet concerne le

bien-être des lapins en élevage, il est donc nécessaire de réaliser des observations sur les animaux eux-mêmes, élevés dans différentes conditions.

11728 La présence possible de roches actinolites dans les granulats d'enrobés routiers pose actuellement la question du risque sanitaire de l'exposition à ces particules.

Sous sa forme allongée (on parle alors de morphologie asbestiforme), l'actinolite est l'un des cinq minerais de la famille des amphiboles qui forme, avec le chrysotile, le groupe des amiantes. Dans l'environnement naturel, l'actinolite (mais également les autres amphiboles) peut se présenter sous différentes morphologies, asbestiformes ou non asbestiformes. Seules les morphologies asbestiformes des amphiboles et le chrysotile font l'objet d'une réglementation. Toutefois, lorsqu'une contrainte mécanique est appliquée sur les roches contenant de l'actinolite ou une amphibole non asbestiforme homologue des amphiboles réglementées, ces minéraux sont susceptibles de se cliver pour donner des particules plus ou moins allongées appelées « fragments de clivage ». Les effets pulmonaires délétères de l'amiante (fibrose et cancer) étant dus à sa forme allongée, la question de la toxicité de ces fragments de clivage, auxquels sont susceptibles d'être exposés les travailleurs intervenant sur les enrobés routiers, se pose ainsi largement.

Dans son rapport d'expertise collective sur les "Effets sanitaires et identification des fragments de clivage d'amphiboles issus des matériaux de carrière", l'ANSES recommande de conduire des études de toxicologie afin d'identifier de nouvelles caractéristiques potentiellement responsables de leur toxicité, en utilisant des échantillons de particules minérales allongées (PMA), rigoureusement caractérisés, qui incluent des roches asbestiformes ou non. En effet, si un lien entre l'exposition de populations à certaines amphiboles [...] et la survenue de cancers a été établi dans des évaluations récentes, les études épidémiologiques ne permettent pas d'attribuer les effets sanitaires observés aux seuls fragments de clivage, les populations étudiées étant exposées à des mélanges complexes de particules, comprenant notamment des particules asbestiformes. Cependant elles ne permettent pas d'exclure un risque pour la santé liée à l'exposition aux fragments de clivage issus des variétés non asbestiformes des cinq amphiboles réglementaires. Par ailleurs, il n'existe aucune donnée toxicologique permettant d'affirmer que les fragments de clivage répondant aux critères dimensionnels des fibres « OMS » ($L > 5 \mu\text{m}$; $D < 3 \mu\text{m}$ et $L/D > 3$) sont moins toxiques que leurs homologues asbestiformes.

A la demande du Ministère de la Transition Ecologique et Solidaire, l'objectif de ce projet est de mener une étude comparative de la toxicité pulmonaire induite par des fragments de clivage d'actinolite et de fibres d'amiante (regroupés sous le terme générique de PMA).

Ce projet sera réalisé sur 1934 rats mâles, qui seront utilisés pour des essais de mise au point et de validation, et une étude principale. Celle-ci consistera en l'évaluation de la toxicité de mélanges de PMA (un maximum de 7 mélanges seront testés) comparativement à des fibres d'amiante administrés par instillations intratrachéales. Dans un 1er temps, les analyses qui seront réalisées *ex vivo* feront l'objet d'essais techniques pour évaluer la faisabilité et la pertinence des tests d'intérêt. 174 animaux, sachant 3 animaux par modalité testée, seront consacrés à ces essais. Elles seront ensuite validées par l'exposition à deux types de fibres d'amiante. 420 animaux, sachant 12 animaux par modalité testée (répartis en 2×6 animaux par groupe car tous les tests ne seront pas réalisables sur les mêmes animaux), seront consacrés à ces essais. Des mélanges de PMA seront ensuite testés et leurs résultats comparés à ceux des animaux exposés à l'amiante. Trois temps et trois niveaux d'exposition seront testés pour chaque mélange de particules. 1260 animaux, sachant 12 animaux par modalité testée, (répartis en 2×6 animaux par groupe car tous les tests ne seront pas réalisables sur les mêmes animaux) seront consacrés à cette étude.

Des cellules circulantes pulmonaires seront collectées, ainsi que les poumons et des échantillons de sang pour déterminer au moyen d'une batterie d'analyses biochimiques, histologiques, immunohistochimiques et génotoxiques, les potentiels fibrosant et cancéreux des mélanges de PMA.

Au plan de la réduction, plusieurs paramètres biologiques seront évalués sur chaque animal, permettant ainsi de minimiser le nombre de rats utilisés.

Concernant le raffinement, les conditions d'hébergement des animaux seront enrichies pour favoriser leur bien-être. Ils seront pour cela hébergés à plusieurs par cage pour leur socialisation. Un fond sonore musical sera diffusé la journée pour leur permettre de s'habituer au bruit généré par les manipulations et ainsi limiter le stress pouvant être ressenti durant les expérimentations. Du matériau leur permettant de nidifier et des bâtons en bois à ronger seront également disposés dans leurs cages d'hébergement pour favoriser leur développement cognitif.

Pour ce qui est du remplacement, les études cliniques et les méthodes alternatives à l'expérimentation animale, de par leurs limitations éthiques et techniques, ne peuvent pas répondre au questionnement concernant la toxicité des fragments de clivage d'actinolite sur l'ensemble des paramètres qui seront analysés, nécessitant de fait le recours aux études *in vivo*. Par rapport à la problématique abordée, la toxicité de l'amiante a largement été étudiée chez le rat, ce qui légitime la continuité des expérimentations chez cette espèce, plutôt que chez la souris, pour confronter de manière pertinente les résultats de différentes études.

Les animaux seront également anesthésiés et traités avec un antalgique préalablement à la réalisation des instillations IT. Un animal présentant une pathologie pouvant être soulagée recevra également un traitement médicamenteux adapté.

11729 Le dépistage précoce des cancers et les progrès de leurs traitements ont considérablement augmenté les taux de survie des jeunes patientes mais la reproduction est largement affectée. La préservation de la fertilité est donc un enjeu majeur dans la prise en charge de ces patientes.

Dans l'ovaire de la femme, le stock des cellules de la reproduction (follicules) est fixé tôt au cours de la vie et ne cesse de décroître jusqu'à la ménopause. Ce stock est régulé par plusieurs facteurs dont une hormone ovarienne (AMH). Les effets de la chimiothérapie conduisent à une réduction drastique de ce stock, ce qui se traduit par une altération de la fertilité et une ménopause prématurée.

Des données préliminaires indiquent que l'AMH aurait un rôle protecteur sur l'effet délétère de la chimiothérapie (cyclophosphamide). Notre projet vise à élucider le mécanisme d'action de l'AMH sur le stock de follicules et ainsi à évaluer son rôle protecteur. Nous utiliserons la souris comme modèle d'étude car l'expérimentation est impossible chez la femme. Des résultats *in vitro* suggèrent que l'AMH induirait un processus de dégradation cellulaire (autophagie) important dans la survie des cellules. L'hypothèse de ce rôle protecteur sur la survie des follicules par stimulation de l'autophagie doit être validée *in vivo* sur des souris.

Les animaux recevront une injection d'AMH en association ou non avec le cyclophosphamide et une injection d'un agent pharmacologique (chloroquine), inhibiteur de l'autophagie. L'autophagie dans l'ovaire sera évaluée par des approches biochimiques et par une analyse histologique des coupes de tissus. Les souris seront hébergées dans des conditions d'élevages enrichies de façon à améliorer leur bien-être. Dans l'objectif de suivre la règle des 3R, et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques, nous limiterons le nombre d'expériences et de souris nécessaires. Le nombre d'animaux utilisés sera de 156 afin d'obtenir une puissance statistique suffisante pour la comparaison des différents groupes et conditions. Le remplacement n'est pas possible car il n'existe pas de modèle de cellules ovariennes reproduisant la structure de l'ovaire. La durée des études sera limitée à une période de 5 jours pour le raffinement de l'expérimentation. Une surveillance journalière sera assurée après les injections. Des points limites sont établis et entraîneront la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes de la préservation de la fonction ovarienne après chimiothérapie. Si le traitement par AMH s'avère efficace, il pourrait être testé chez la femme pour limiter la perte de follicules renfermant les cellules germinales. Ceci constituerait une avancée clinique majeure dans la préservation de la fertilité de la femme.

11730 Les modifications génétiques ont longtemps été associées au développement tumoral. Avec l'avancée des connaissances sur les mécanismes moléculaires du cancer, la recherche s'est orientée sur l'aspect épigénétique de cette maladie. En effet, la dérégulation des marques

épigénétiques joue un rôle prépondérant dans la tumorigenèse. Ces avancées ont permis de développer des « épidrugs » modulant les acteurs responsables des dérégulations dans l'initiation mais aussi dans la progression tumorale.

La validation de marqueurs tumoraux pour des études de thérapie est généralement réalisée sur des modèles précliniques. Notre laboratoire a mis en évidence des modifications épigénétiques associées à la progression tumorale du cancer de la prostate. Notre étude se focalise sur la déméthylase d'histone JMJD3. Plusieurs études montrent qu'elle joue un rôle dans le développement de différents types de cancer dont celui de la prostate. Le but est de voir si le blocage chimique *in vivo* de cette protéine impacte la croissance de tumeurs prostatiques (LnCap-Luc, PC3-Luc et DU145-Luc) mais aussi la régulation de gènes impliqués dans ce type de cancer afin d'identifier une nouvelle approche thérapeutique.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction, Raffinement). L'ensemble du projet comprendra 210 souris nudes Balb/c mâles sur 5 années.

Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée.

En effet, de nombreuses études *in vitro* réalisées en amont ont permis de remplacer l'utilisation des animaux. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer les effets potentiellement indésirables sur d'autres organes d'une nouvelle thérapie. Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles.

La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

11731 Le soulagement de la douleur est défini comme un droit fondamental et est inscrit dans le code de la santé publique. L'évaluation et le traitement de la douleur sont au cœur des préoccupations de la médecine moderne avec la création de comités de lutte contre la douleur (CLUD). Le quatrième plan national de lutte contre la douleur définit 3 axes de lutte : la douleur aiguë (post chirurgicale), la douleur chronique et la douleur liée aux soins.

La douleur viscérale qui entre dans ces trois champs d'action est celle dont les mécanismes sont les moins élucidés et ses traitements sont mal codifiés et malheureusement peu efficaces.

Néanmoins certaines études ont mis en évidence l'activation des mécanismes inflammatoires après la survenue d'une douleur viscérale aussi bien au niveau de la moelle épinière qu'au niveau du cerveau. Cette activation inflammatoire serait médiée par l'activation des cellules de la microglie. La microglie est l'ensemble des cellules dérivées des macrophages présentes à l'état quiescent dans le système nerveux central et ayant pour rôle de le protéger contre les agressions.

On sait aussi dans la douleur neuropathique, une autre cellule du système nerveux central est activée par la microglie : l'astrocyte. Il est donc possible que la communication entre microglie et astrocytes joue un rôle important dans la douleur viscérale et que les astrocytes soient des cellules actives dans les processus de transmission de la douleur viscérale.

Le but de ce travail est donc de travailler successivement sur la douleur viscérale aiguë puis sur la douleur viscérale chronique et d'évaluer dans les deux cas successivement le rôle de ces cellules (microglie et astrocytes) et de tester des agents antalgiques qui pourraient avoir un rôle efficace dans ce type de douleur. Le projet comportera donc les étapes suivantes et similaires pour les deux types de douleur.

- dans un premier temps évaluer si les astrocytes sont activés pendant le trajet du message douloureux viscéral.

- si cela est vérifié, d'étudier l'interaction entre astrocytes et microglie. Dans la douleur neuropathique, l'interaction microglie-astrocyte est médiée par l'activation de protéines

intracellulaires que l'on appelle les MAP kinases et notamment l'une d'entre elle : P38. Nous souhaiterions savoir si P38 est aussi impliquée dans la douleur viscérale. Nous comparerons l'efficacité d'un médicament antalgique qui bloque l'action de cette P38 (losmapimod) à l'action antalgique d'un médicament déjà connu pour son action dans la douleur viscérale (un anesthésique local, la bupivacaïne). Ces comparaisons seront faites par des études comportementales chez l'animal entier et par des études au niveau de la moelle et du cerveau.

En appréhendant mieux les chemins d'activation de la douleur viscérale aiguë et chronique, nous serons plus à même de pouvoir avoir une thérapeutique ciblée et d'être plus performants pour le traitement de la douleur viscérale aussi bien chronique qu'aiguë.

Il n'est pas possible de remplacer l'expérimentation animale dans ce type d'étude car il n'y a pas de méthode alternative possible à la mesure de la douleur chez l'animal. Le modèle animal est une étape indispensable pour évaluer l'intégration de tous les circuits complexes de la douleur.

Dans une perspective de réduction, nous avons calculé le nombre d'animaux au plus juste en utilisant les méthodes statistiques les plus efficaces (calcul de puissance entre autres). De plus, les différentes phases se feront successivement afin de tirer les conséquences sur le programme expérimental (et donc du nombre d'animaux) en le modifiant en fonction des résultats des étapes précédentes. Des rats mâles adultes Sprague-Dawley provenant d'un élevage agréé seront utilisés. Les actes douloureux (injections notamment) se feront sous anesthésie générale. De plus nous avons essayé autant que faire se peut, de faire le plus d'expérimentations au sein d'une même procédure, ceci sans soumettre les animaux à un stress supplémentaire. Les conditions d'hébergement seront adaptées au mieux (petits groupes d'animaux par cage, acclimatation avec le même expérimentateur pendant 10 jours avant les tests, enrichissement des cages [rouleaux et jouets]). La surveillance des animaux sera rapprochée et des points limites sont prévus pour tous les tests. Nous avons estimé le nombre d'animaux nécessaires à 138 rats au maximum.

11732 Le gros intestin du cheval abrite une flore bactérienne abondante et diversifiée qui assure un rôle nutritionnel crucial et participe à la santé de l'hôte. La stabilité de cette flore repose sur un équilibre fragile et de nombreux facteurs peuvent la perturber. Parmi ceux-ci les changements brusques d'alimentation chez le cheval induisent des modifications de la structure des populations bactériennes. Le remplacement d'un concentré fibreux par un concentré riche en amidon peut favoriser la survenue d'une colique et l'initiation d'une réaction inflammatoire de la muqueuse intestinale, parfois létale, chez le cheval. Aucune étude ne montre de lien entre une perturbation de l'écosystème du gros intestin et le développement d'une réaction inflammatoire, chez le cheval. Chez d'autres modèles mammifères, une modification de l'écosystème induirait une dérégulation des mécanismes immunitaires responsable d'une réponse inflammatoire pouvant affecter l'intégrité de la muqueuse intestinale. Il est donc important de limiter les déséquilibres de la flore bactérienne du gros intestin lors de changements alimentaires brusques pour diminuer la survenue de colites et favoriser la santé et le bien-être du cheval. Une voie semble prometteuse : celle des probiotiques.

Les probiotiques sont des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé de l'hôte ». A ce jour, aucune bactérie n'est enregistrée en tant qu'additif zootechnique chez le cheval, en Europe. Pourtant, des études montrent l'intérêt des probiotiques bactériens pour limiter les perturbations de la flore intestinale du cheval. Par exemple, la digestibilité des nutriments et l'activité microbienne sont augmentées lors d'une supplémentation en probiotiques bactériens. Ils permettent également de limiter les perturbations de la flore bactérienne intestinale. Néanmoins, l'effet des probiotiques bactériens sur la réaction inflammatoire locale dans le gros intestin n'est pas évalué dans la littérature.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité *in vivo* d'un probiotique bactérien sur l'écosystème et la muqueuse du gros intestin lors d'une réaction inflammatoire aiguë, chez le cheval. L'utilisation d'animaux vivants dans l'étude est requise pour déterminer l'efficacité *in vivo* des probiotiques bactériens chez le cheval afin d'obtenir une homologation européenne. Le remplacement du cheval par un autre modèle animal ou par un essai *in vitro* ne permettra pas de demander l'homologation.

Deux lots homogènes de six hongres Trotteurs Français adultes, l'un étant supplémentés avec un probiotique bactérien et l'autre non, sont conduits, en parallèle, pendant dix semaines. Ce dispositif permet de réduire au minimum le nombre d'animaux inclus dans l'étude tout en ayant la puissance statistique nécessaire pour mettre en évidence l'effet de la supplémentation en probiotiques bactériens. En effet, les chevaux sont conduits en conditions contrôlées et uniformes afin de minimiser les variations liées à l'environnement.

L'investigation innovante de marqueurs dans le sang et les fèces sera privilégiée à la pratique d'un examen endoscopique et permettra de limiter l'angoisse et la souffrance des chevaux. D'autres mesures de raffinement sont mises en œuvre pour éviter la souffrance des animaux. Par exemple, le nombre de prélèvements fécaux et sanguins sera limité à sept pour toute la durée de l'étude, et ils seront séparés de deux jours pour les deux premiers, puis d'une semaine pour les suivants et enfin de quatre semaines pour le dernier (J0, J2, J7, J14, J21, J28 et J56).

Le déséquilibre de l'écosystème intestinal et l'inflammation légère sont générés par un changement brusque d'aliment. Le remplacement d'un concentré riche en fibre par un concentré riche en amidon permet d'évaluer l'impact des probiotiques bactériens en tant que « stabilisateur de flore » chez le cheval. L'apport excessif d'amidon suite à un changement d'aliment est une pratique courante dans la conduite des chevaux de loisir et de sport. Toutefois, pour assurer la sécurité des animaux, une procédure de surveillance quotidienne est instaurée. Elle évalue les comportements et/ou les signes cliniques anormaux témoignant du mal-être ou de souffrance des chevaux. Le personnel animalier signale les signes inhabituels au responsable de l'expérimentation. Les chevaux qui présenteraient des signes de mal-être ou de souffrance seront soignés et si jugé nécessaire par le vétérinaire traitant retirés de l'essai.

11733 Le cerveau est constitué de 100 milliards de cellules nerveuses appelées neurones qui établissent chacun 10000 connexions avec les autres neurones du cerveau. Ces connexions appelées synapses, transmettent l'information d'un neurone à l'autre. Ce phénomène est à l'origine de nos facultés d'apprentissage et de mémorisation. Nous avons montré qu'une petite molécule appelée SUMO pouvait réguler le flux d'information entre les neurones du cerveau. Ainsi, notre hypothèse de travail est qu'un défaut dans la production de cette molécule dans les neurones pourrait conduire à des anomalies de communication cérébrale et en conséquence, à de nombreux désordres neurologiques. Nos expériences ont donc pour but d'avancer notre compréhension du rôle de cette molécule au niveau neuronal ce qui permettra à moyen terme de comprendre comment les cellules nerveuses communiquent entre elles, et à plus long terme, d'étudier les pathologies du système nerveux où la communication entre les neurones du cerveau est altérée.

Nous focalisons notre attention sur la détermination des conséquences physiologiques de cette molécule sur une protéine essentielle pour le développement cérébral et la maturation neuronale, la protéine FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein).

Le syndrome de l'X-Fragile est la forme la plus fréquente de déficience intellectuelle héréditaire liée au chromosome X et la première cause monogénique connue d'autisme. Ce syndrome résulte de la mutation du gène FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1) sur le chromosome X.

Il existe un modèle murin mimant la pathologie humaine. Ces animaux récapitulent les symptômes observés chez les individus X-Fragile. En effet, ces souris n'expriment pas la protéine FMRP ce qui conduit à des anomalies morphologiques de la synapse qui vont être responsables de troubles d'apprentissage et de mémorisation. Ces souris présentent également des défauts de connectivité synaptique résultant des altérations morphologiques de leurs épines dendritiques. FMRP joue donc un rôle clé dans le développement cérébral, la maturation des épines dendritiques et la communication neuronale.

Nous avons montré le rôle physiologique joué par la sumoylation de la protéine FMRP. Pour comprendre le rôle de cette sumoylation dans le syndrome de l'X Fragile, il nous faut utiliser des cultures primaires de neurones qui seront réalisées à partir d'embryons de souris sauvage et modèle de la maladie. Notre projet fait donc intervenir l'utilisation de souris gestantes C57Bl/6 ou

knock-out (KO) ou encore Knock-in (KI) pour notre molécule FMRP sur ce même fond génétique C57Bl/6 qui présentent un phénotype non dommageable.

A cause de la particularité physiologique unique des neurones qui consiste en l'impossibilité de se diviser et de l'absence de lignées cellulaires permettant d'approcher la complexité neuronale, l'utilisation de cultures primaires de neurones reste à ce jour inévitable. Nous ne pourrions donc pas appliquer le principe de remplacement. Cependant à long terme, nous pourrions éventuellement envisager d'acquérir la technique de la génération d'organoides cérébrales à partir des cellules souche embryonnaires sauvages, si les tests préliminaires se révèlent concluants.

Le système de culture primaire de neurones que nous utilisons est standard et utilisé par tous les groupes de recherche à travers le monde. Ainsi, la culture primaire de neurones (réalisée à partir d'embryons de souris à 15 jours embryonnaires) reste une approche indispensable pour la réalisation de notre projet.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, un calcul du nombre d'animaux nécessaire a été réalisé afin de pouvoir valider nos résultats statistiquement comme décrit dans la procédure 1.

Les cerveaux des femelles gestantes seront systématiquement prélevés et utilisés pour réaliser les études biochimiques au stade adulte. De même, le cerveau des mâles reproducteurs sera prélevé chaque année pour les études au stade adulte.

Pour chaque expérience, 1 femelle gestante souris contrôle (WT), invalidé pour Fmr1 (KO), ou exprimant une mutation dans Fmr1 (KI) responsable de la maladie seront sacrifiées pour réaliser les cultures de neurones. Un des avantages de réaliser ces cultures en parallèle est de pouvoir utiliser le même contrôle WT pour chaque génotype ce qui limite considérablement l'utilisation d'animaux WT.

Ce projet ne comporte qu'une procédure de classe légère. La procédure mettant en œuvre des animaux dans ce projet sera réalisée dans l'optique de minimiser la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux dans une optique de raffinement. Notamment, les conditions d'élevage seront standardisées et en adéquation avec le bien-être des animaux, de façon à obtenir des animaux élevés de manière la plus homogène possible, ceci diminuera les variations entre individus pour les analyses statistiques. Les souris utilisées seront élevées en cage réglementaire. Chaque environnement sera enrichi pour leur bien-être avec des maisonnettes en polycarbonate (igloo rouge) et carrés de ouate, ainsi que des morceaux de bois, mis sous la litière afin de stimuler la curiosité des animaux. Les méthodes d'euthanasie utilisées sont réglementaires et sont choisies afin de respecter le bien-être animal de par leur efficacité d'exécution.

Le nombre total d'animaux qui sera utilisé sur les 5 ans du projet afin de pouvoir réaliser des expériences contrôlées avec une reproductibilité adéquate est de 2340 embryons, et 390 souris adultes (femelles reproductrices).

11734 Le vieillissement est un processus physiologique entraînant une modification structurelle et fonctionnelle des organes. Il est considéré comme un facteur de risque pour les pathologies rénales et cardiaques qui semblent être des accélérateurs du vieillissement et prédisposent les individus à la fragilité. Un des enjeux économique, sanitaire et social, est de prolonger la durée de vie des personnes âgées tout en préservant leur autonomie par une meilleure prévention et prise en charge des pathologies associées à l'âge. Cet objectif est limité par le manque de modèles prédictifs d'un vieillissement prématuré des organes et de la détérioration de leur fonction.

Ces pathologies sont liées au stress oxydant, un déséquilibre entre les capacités antioxydantes de la cellule et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dont une des sources est la monoamine oxydase A (MAO-A). Cette enzyme localisée sur la membrane externe des mitochondries inactive les neurotransmetteurs comme la sérotonine et la norépinephrine et produit du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) engendrant la sénescence.

De nos jours, on sait que la surexpression de MAO-A d'une enzyme dans le cœur entraîne une sénescence mort accélérée des cellules cardiaques et une progression vers le développement d'une insuffisance fonctionnelle. Au niveau rénal, il a été démontré chez le rat, que l'H₂O₂ qu'une

molécule joue un rôle dans le stress oxydatif et la mort cellulaire causant des dommages fonctionnels et structurels apparaissant lors de pathologies rénales.

A l'heure actuelle, tous les modèles de senescence d'organes impliquant l'utilisation des animaux de laboratoire durent 2 à 3 ans.

Le but de ce projet est de valider et d'étudier un modèle préclinique du vieillissement rénal accéléré et d'identifier les mécanismes de senescence mortels après surexpression d'une enzyme dans le rein. Cette étude au protocole court, permettra d'avoir des informations sur les mécanismes et les conséquences de l'augmentation du stress oxydant et de mettre en évidence l'intérêt des inhibiteurs de l'enzyme pour prévenir l'insuffisance rénale liée au vieillissement. Ces informations pourront être récoltées plus rapidement grâce à l'ablation d'un rein qui permettra l'accélération du processus de vieillissement.

Pour la réalisation de ce projet, nous utiliserons 80 rats (40 rats transgéniques ayant une surexpression d'enzymes et 40 rats contrôles ou sauvages).

Les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE dans un milieu enrichi assurant leur bien-être. En accord avec la règle de raffinement, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante.

Pendant les semaines 1,3, 5 et 7 (c'est-à-dire tous les 15 jours), des prélèvements d'urine par hébergement en cage métabolique pendant 24 h et des prélèvements de sang à la veine caudale (environ 500 µl), seront réalisés. Ces prélèvements nous permettront de mesurer et d'analyser des biomarqueurs d'intérêts. Par ailleurs, l'utilisation de cages à métabolisme représente une méthode non-invasive permettant de mesurer la fonction rénale sans recourir à la mise à mort à différents temps des animaux. Grâce à cette méthode le nombre d'animaux utilisés est sensiblement réduit.

A la fin de la semaine 7, une ablation du rein gauche sera ensuite réalisée afin 'd'amplifier' le vieillissement rénal.

Pendant les semaines 9, 11, 13 une deuxième série de prélèvements d'urine par hébergement en cage métabolique pendant 24 h et des prélèvements de sang à la veine caudale (environ 500 µl), seront réalisées. A la fin de ce protocole (environ 4 mois) les animaux seront mis à mort.

Tout animal présentant des signes de douleur sera écarté de l'étude le temps de son rétablissement ou sacrifié si aucune solution n'est applicable.

En fin de protocole (4 mois), les animaux seront mis à mort et le rein restant sera prélevé afin de faire différents tests moléculaires. et utilisé pour des tests d'évaluation du stress oxydant, de l'immunohistochimie (détections des marqueurs spécifiques du vieillissement) et la biologie moléculaire (détections des gènes impliqués).

Nous utiliserons 80 Rats (dont 40 transgéniques et 40 non transgéniques). Ils seront hébergés selon la directive européenne 2010/63/UE dans un milieu enrichi composé de tunnels en polycarbonates et aspen brick pour réduire le stress. La manipulation des animaux sera effectuée par du personnel formé pour réaliser les gestes techniques prévus pour ce projet.

11735 Environ 15% des cas d'infertilité masculine ont une origine immunologique, de l'inflammation chronique à la réaction auto-immune qui détruit les spermatozoïdes. Notre objectif est d'acquérir une meilleure connaissance du système immunitaire et de son organisation au sein des organes sexuels mâles, et plus particulièrement au niveau post-testiculaire. En effet, suite à leur production dans le testicule, les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant au cours d'une phase de maturation post-testiculaire. Du point de vue immunologique, il y a un véritable challenge : contrôler efficacement les pathogènes entrants tout en évitant un emballement de la réponse immunitaire pouvant mener à une réponse auto-immune et donc à une infertilité. Ce deuxième axe fait l'objet d'un projet de recherche au sein de l'équipe. Actuellement, aucune publication ne décrit le ganglion drainant de l'épididyme alors même qu'il est le lieu d'initiation des réponses immunitaires. Notre objectif est donc d'identifier le ganglion drainant de l'épididyme murin par l'injection d'un antigène fluorescent dans l'organe et son suivi en temps réel. Ce projet s'applique à combler l'exigence de

la règle des 3R. En effet, le nombre d'animaux est réduit car nous aurons recours à une dizaine de souris mâles BALB/c sauvages afin d'atteindre notre objectif, qui est purement descriptif. Notre étude portant sur l'immunité des organes reproducteurs mâles, nous utiliserons des souris mâles sexuellement matures, âgées de trois à six mois. Le deuxième R s'attache au raffinement des conditions de vie des animaux or la souffrance créée par l'opération et l'injection, réalisées sous anesthésie générale, est modérée selon les critères officiels (arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales). Cependant, les animaux seront supplémentés en anti-douleurs après l'opération et surveillés jusqu'à leur réveil puis quotidiennement. Une prostration de vingt-quatre heures ou une altération du pelage ou de l'appétit entraînera leur sortie du protocole, voire leur sacrifice, en fonction de la gravité de leur état. Finalement, le troisième R, qui vise à remplacer l'expérimentation sur animaux ne peut malheureusement pas s'appliquer dans notre étude. En effet, le recours au modèle animal est ici incontournable étant donné que nous devons suivre la migration de la molécule fluorescente au cours du temps. Notre choix du modèle murin repose sur le fait que la souris est une référence en immunologie. De plus, l'objectif à long terme est d'étudier la réponse immunitaire mise en place dans l'épididyme murin et de nombreux mécanismes, cellules immunitaires et cytokines sont communs à l'homme et à la souris. Cette première étape est indispensable au bon déroulement du projet qui amènera à une meilleure compréhension de l'environnement immunitaire de l'épididyme, des mécanismes mis en jeu dans les réponses aux pathogènes du tractus uro-génital et pourrait à terme permettre une prise en charge adaptée de l'infertilité masculine. Nombre d'animaux : 10 souris mâles.

11736 La fistule anastomotique est la présence d'une fuite entre la cavité interne du colon et l'abdomen. Elle représente la plus importante complication et cause de mortalité après résection colorectale chez l'homme. Elle touche des patients opérés pour cancer du côlon, du rectum ou maladies chroniques inflammatoires de l'intestin. Les fistules engendrent souvent des ré-interventions avec un suivi particulièrement onéreux et contraignant. Ce projet vise à réduire le taux de fistules anastomotiques avec un implant résorbable innovant qui assure un renfort dynamique et favorise une régénération tissulaire solide et pérenne de la paroi colorectale avec un design adapté aux protocoles opératoires actuels.

Dans ce but, des études de sélection *in vitro* ont été réalisées pour fabriquer et sélectionner des implants dont les caractéristiques sont compatibles avec une implantation colorectale (résistance, maniabilité, ..). Cette première étape de sélection a permis de réduire le nombre d'animaux avec une approche de remplacement (dégradation *in vitro*) et de définir les implants les plus prometteurs (R de remplacer). La seconde étape de sélection a été réalisée chez le lapin afin de valider sur un modèle moyen animal les paramètres d'applicabilité et de réductions des fistules et sélectionner parmi les différents dispositifs les plus prometteurs. Cette étape étant désormais terminée, ce projet a pour objectif de suivre la résorption de l'implant en condition réelle d'application au niveau colorectal chez le porc qui est le modèle le plus proche de l'homme en terme d'applicabilité et translation clinique.

Une étude principale sera menée au cours de ce projet sur 12 porcs pour atteindre cet objectif.

Afin de répondre à cet objectif le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable l'interaction d'un organisme vivant entier avec ce nouveau dispositif médical. En effet le comportement du dispositif se modifie avec le pH de l'organisme et les mouvements de l'intestin. La réponse immunitaire peut également influencer la dégradation du dispositif et sa performance dans la réduction des fistules.

Cette espèce animale (le porc), utilisée en expérimentation animale et principalement pour les modèles avec chirurgie, a été décrite dans la littérature scientifique sur des modèles de fistules colorectales et permettra d'une part de gérer son bien être au cours de l'étude et de travailler sur une espèce de grandes tailles facilitant l'intervention.

Afin de suivre le devenir de l'implant au niveau colorectal, l'imagerie médicale et notamment l'imagerie scanner sera utilisée. C'est une technique non invasive et non douloureuse qui requiert

seulement une légère anesthésie des animaux durant l'examen. D'un point de vue éthique, elle permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaire car les animaux pourront être conservés au long de l'étude (R de Réduire).

Des critères d'interruption ou points limites seront définis afin de prévenir toute forme de souffrance des animaux. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe clinique anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires le plus rapidement possible avec les traitements adaptés (R de raffiner). Lors des chirurgies qui consistent en la résection d'une petite partie du rectum et la mise en place de l'implant au moment de la suture, un suivi post-opératoire sera effectué sur chaque animal en vérifiant son état de bien être et de santé, et en lui administrant des traitements ou soins locaux adaptés. Pour l'ensemble de ces chirurgies une analgésie et antibiothérapie sera administré avec une période de soins et d'attentions cliniques postopératoires réalisée afin de détecter tout signe clinique anormal, non reprise du transit, anorexie, etc et ainsi prendre les mesures nécessaires rapidement et de façon adéquate.

Ce projet permettra de valider la dégradation et l'efficacité de ce nouveau dispositif médical (ou DM) et de sélectionner les prototypes pour une demande de mise sur le marché d'un nouveau dispositif médical.

11737 Malgré les progrès récents des approches thérapeutiques anticancéreuses, la France enregistre 54 000 nouveaux cas de cancer de sein qui conduit à 12 000 décès par an. Le cancer de sein triple négatif (TNBC) est responsable en grande partie de ces chiffres alarmants. Il est caractérisé par l'absence de récepteurs aux œstrogènes, aux progestérones et au récepteur de facteur de croissance épidermique humains, HER2 ; ce qui rend les traitements ciblés et/ou hormonaux en partie inefficaces. Face à ce problème de santé publique, différents traitements et molécules dotées de potentiels anticancéreux ont été développées depuis ces dernières années. Les micro-organismes tels que les microalgues font partie de ces nouvelles classes d'agents thérapeutiques. A ce titre, la microalgue *Dunaliella* est documentée pour sa production de molécules bioactives à hautes valeurs ajoutées en vitamines, chlorophylles, glycérol, lipides polyinsaturées ou encore caroténoïdes. Certaines de ces molécules sont connues pour leurs propriétés anticancéreuses. Au laboratoire, nous avons mis au point une méthode de culture de microalgues *Dunaliella* qui permet d'augmenter la quantité de production de ces structures bioactives. Nos études *in vitro* ont permis d'établir leurs propriétés anti tumorales remarquables. L'objectif de l'étude consiste maintenant à valider leurs potentiels anticancéreux dans un modèle animal du cancer du sein triple négatif. Etant donné la complexité du processus métastatique qui est dépendant du microenvironnement, du système immunitaire et hormonale ou encore des aspects de colonisation d'organes à distance ; cette étude de validation finale ne peut être réalisée dans des modèles de culture cellulaires simplifiées et/ou de substitutions. Nous proposons de réaliser cette étude dans le modèle murin de cancer du sein triple négatif 4T1 que nous maîtrisons au laboratoire. Ce modèle consiste à implanter dans les glandes mammaires des souris BALB/c, les cellules de carcinome mammaire 4T1 puis de traiter les tumeurs solides avec les extraits de microalgues. L'efficacité du traitement sera suivie par imagerie ultrasonore (échographie) pour quantifier la surface et le volume des tumeurs au cours du temps et des traitements. De par notre expérience significative et notre expertise dans l'utilisation de ce modèle animal, nous sommes en mesure d'anticiper l'apparition de douleurs ou de stress chez ces animaux. Nous avons également une bonne maîtrise du point limite de ces animaux qui nous permet de sacrifier les animaux avant l'apparition éventuelle de douleurs inutiles. Par ailleurs, notre méthode d'imagerie ultrasonore est non douloureuse (raffinement) et permet un suivi individuel longitudinal des animaux. Ces deux points permettent de réduire de façon très significative le nombre d'animaux à inclure dans l'étude. Nous avons également prévu un point limite anticipé qui nous permet de limiter toutes douleurs animales notamment celles liées à la présence des tumeurs. Par conséquent notre protocole s'inscrit pleinement dans les recommandations des lignes de conduite à tenir pour réduire, raffiner et remplacer (règle des 3R) les expérimentations animales à leur strict minimum A ce titre, notre étude comporte 7 lots de 5 souris soit en tout 35 animaux, nombre minimal et nécessaire d'animaux pour réaliser des études statistiques fiables et définitives sans répétition de l'expérimentation.

11738 Objectifs

Ce projet a pour objectif d'évaluer la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de nouveaux produits pharmaceutiques vétérinaires destinés aux chats et aux chiens. Il pourra concerner toute sorte de produits présentant un bénéfice pour la santé des chiens ou des chats ou leur apportant un meilleur bien-être. Il pourra s'agir par exemple d'antiparasitaires, d'antibiotiques, d'antidiabétiques, d'antihypertenseurs, ou de produits destinés aux maladies respiratoires, cardiaques, métaboliques, nerveuses ou oculaires.

Avantages/dommages : La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'une substance active contenue dans un médicament après son administration. La pharmacodynamie a pour but d'étudier l'action exercée par un ou plusieurs principes actifs sur l'organisme, en particulier les effets biochimiques et physiologiques des médicaments sur l'organisme. La pharmacocinétique et la pharmacodynamie contribuent à expliquer la relation entre la dose et la réponse, c'est-à-dire, l'effet du produit. Ce sont des informations nécessaires au choix de la posologie et de la voie d'administration du produit, préalable à la réalisation des études réglementaires d'efficacité et d'innocuité. Ces informations sont nécessaires à l'autorisation de mise sur le marché de nouveaux produits.

On ne s'attend pas à des effets secondaires notables. En effet, la plupart des produits à l'étude ont déjà fait preuve de leur innocuité chez d'autres espèces.

Informations sur les espèces utilisées

Un total de 200 chats et 200 chiens sont prévus pour la durée du projet (5 ans).

Mise en œuvre des 3R's :

Remplacement : Il n'existe pas à ce jour de méthode alternative au recours à l'animal permettant d'évaluer la pharmacocinétique ou la pharmacodynamie des produits pharmaceutiques vétérinaires.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé est limité au maximum, de façon à répondre aux exigences réglementaires et scientifiques des études. La variabilité individuelle des réponses aux traitements contraint à constituer des effectifs statistiquement significatifs.

Raffinement : Il n'est pas attendu de réaction importante au cours du projet, ni de douleur intense ou prolongée.

Dans les cas de stress/inconfort liés aux prélèvements, un programme de tranquillisation ou anesthésie sera être mis en place. Les animaux sont hébergés en groupe et observés quotidiennement. En cas de problème de santé, l'animal est examiné et traité par un vétérinaire. La Structure en charge du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit au quotidien la mise en œuvre des meilleures techniques de soins et des conditions de vie pour le bien-être des animaux.

11739 « Le syndrome de l'intestin irritable (SII) représente une pathologie fonctionnelle digestive fréquente. Les symptômes principaux sont représentés par la douleur viscérale et une altération de la motricité intestinale (diarrhée, constipation ou les deux conditions alternées). Sa physiopathologie est complexe et mal comprise mais sont évoquées, une hypersensibilité viscérale, une augmentation de la perméabilité intestinale, une micro-inflammation et des modifications du microbiote intestinal. De plus, chez les patients, le stress est reconnu comme un important facteur de risque impliqué dans la l'initiation et l'aggravation des principaux symptômes.

Des études récentes ont mis en évidence que la flore intestinale jouerait un rôle important dans le SII. Il semblerait qu'une des cibles thérapeutiques serait de rétablir l'équilibre de la flore intestinale par le traitement d'appoint comme l'apport en prébiotiques. Le but de projet de recherche est de comparer les effets liés à une consommation chronique journalière d'oligosaccharides sur la perméabilité intestinale dans un modèle animal (souris) de fragilisation et d'altération de l'équilibre du microbiote intestinal i.e. le stress chronique.

Le modèle murin est un modèle pertinent et validé pour l'étude de la fonction de la barrière intestinale dans un cadre de régulation globale par les cellules immunitaires et le système nerveux entérique afin de se rapprocher des conditions de protocole du SII. Ce projet nécessite donc de

travailler sur l'animal, aucun substitut *in vitro* n'est envisageable. Pour ce projet d'une durée de cinq ans un total de 1260 souris sera nécessaire. Toutefois, tout est mis en œuvre pour tenir compte des règles des 3R. En effet, le nombre d'animaux utilisés dans chaque groupe expérimental a été limité en tenant compte de la variabilité interindividuelle qui nécessite d'avoir des effectifs suffisants pour atteindre une validité statistique tout en réduisant au maximum l'inconfort, ainsi que la douleur ou l'anxiété susceptible d'être subie par les animaux. Les souris de cette étude sont des animaux sains provenant d'élevage agréé. Le protocole est correctement planifié afin notamment d'éviter une surpopulation en salle d'hébergement. Les souris seront hébergées dans des conditions normalisées optimales, et suivies quotidiennement pour leur rapporter tous les soins nécessaires. Des buchettes en peuplier seront apportées dans chaque cage afin de répondre au besoin naturel des souris. Si malgré toutes les mesures prises de réduire la douleur au minimum pendant les procédures expérimentales, une souffrance est constatée, la procédure sera systématiquement arrêtée. »

11740 Nous souhaitons analyser et comprendre comment les anomalies à l'origine de pathologies neurodéveloppementales sont générées ainsi que la façon dont les réseaux neuronaux sont altérés, avec l'hypothèse que ces altérations commencent à la naissance.

En effet, de nombreuses études épidémiologiques ont rapporté que la naissance par césarienne avec ou sans prématurité augmenterait le risque de développer des troubles tels que l'autisme. Cependant, ces études restent controversées du fait de l'hétérogénéité des facteurs à prendre en compte lors de la naissance chez l'Homme.

L'autisme (ou troubles du spectre autistique – TSA) est un trouble du développement caractérisé par une perturbation des interactions sociales et de la communication verbale, ainsi que par la présence de comportements restreints et répétitifs. Parmi les modifications rapportées chez les patients atteints d'autisme, une altération de la croissance des cellules et du volume de plusieurs structures distinctes du cerveau sont observées de la naissance jusqu'à l'âge adulte. Ces modifications supportent l'hypothèse que des connexions aberrantes existent entre les différentes structures cérébrales chez ces patients, aberrations qui résultent en un fonctionnement altéré du cerveau. Toutefois, bien que les études cliniques nous aient permis d'observer une altération de la croissance globale du cerveau chez les patients atteints d'autisme, les mécanismes sous-tendant ce changement ne peuvent être étudiés chez l'Homme. C'est pourquoi des modèles murins d'autisme présentant des troubles développementaux et comportementaux similaires à ceux décrits chez l'Homme ont été développés. Dans ces modèles, une modification persistante de la morphologie des neurones est constatée dans de multiples structures cérébrales, avec un sous-développement des neurones observé.

En utilisant les paramètres observés dans de nombreux modèles murins d'autisme, notre objectif est d'approfondir notre compréhension des modifications induisant les TSA en déterminant (1) si des dysfonctionnements périnataux sont responsables, dès la naissance, d'altérations morphologiques permanentes et (2) si le développement est affecté de manière dépendante au facteur périnatal altéré. Pour répondre à ces questions, les modèles animaux sont essentiels car ils permettent d'étudier en conditions contrôlées et reproductibles l'impact réel de la césarienne avec ou sans prématurité sur le risque de développer l'autisme. Pour ce faire, ce projet utilisera les modèles de césarienne chez la souris à terme et pré-terme et de naissance pré-terme par voie naturelle (au total, 302 souris seront utilisées).

Nous effectuerons les manipulations suivantes sur les animaux :

1. Césarienne à terme ou pré-terme chez la souris.
2. Remplacement des nouveau-nés de la mère de substitution par les nouveau-nés nés par césarienne à terme ou pré-terme.
3. Induction de la naissance pré-terme par voie basse en réalisant une injection unique de mifépristone (bloqueur des récepteurs à la progestérone) en sous-cutané chez la souris gestante au stade embryonnaire E17. Après injection, les souris seront surveillées pour détecter le moindre signe de détresse.

4. Tests développementaux : ces tests auront pour but d'évaluer si une modification dans la façon de naître (en modifiant soit le moment, soit la façon de naître) peut induire une altération développementale chez la souris. Les souris seront placées en situation non invasive pour observer leur comportement et développement. Ce type de procédure n'engendrera ni douleur ni contrainte chez les animaux.

Les principes de réduction et de raffinement permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés ont été appliqués à ce projet. Les études que nous souhaitons réaliser se focalisant sur l'organisation des réseaux neuronaux et la naissance, aucun remplacement par des études sur cultures *in vitro* ne peut être effectué. Le principe de réduction a été appliqué en déterminant de manière statistique le nombre d'animaux que nous allons utiliser par objectif et par tâche. Dans cette même optique, lorsque cela est possible, chaque animal servira à plusieurs mesures comportementales. Les animaux seront hébergés au minimum par deux dans des cages équipées de matériaux de nidification en plus de l'enrichissement de base. Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement via la mesure de leurs poids et l'observation de leur aspect physique et comportement.

11741 La pré-éclampsie est une pathologie de la reproduction impactant 1 à 5 % des femmes enceintes dont l'étiologie est encore mal connue. Elle se traduit par une augmentation importante de la pression artérielle associée à une protéinurie chez la mère et des anomalies placentaires, en particulier au niveau vasculaire. Cette pathologie a un impact morbide considérable tant maternel que foetal. Un modèle murin de cette pathologie, avec pour la première fois des augmentations de pression artérielle comparables à ce qui se rencontre dans la pathologie humaine a été mis au point. Les premières études ont consisté à bien caractériser ce modèle du point de vue de la pression systolique.

Nous proposons aujourd'hui d'utiliser des outils non invasifs d'imagerie innovants pour déterminer s'ils peuvent permettre de mettre en évidence les modifications fonctionnelles placentaires associées à la pré-éclampsie.

Pour cela nous utiliserons 250 femelles gestantes avec en moyenne 8 foetus par femelle, soit 2250 animaux. L'imagerie est faite sous anesthésie générale par échographie haute résolution afin d'éviter tout stress ou souffrance chez l'animal. Une grille de points limites entraînant la prise en charge de l'animal ou sa mise à mort anticipée a été établie. Par ailleurs, une attention sera portée au bien-être (enrichissement des cages).

La mise au point des protocoles d'imagerie dans ce modèle représentatif de la pathologie humaine permettra ensuite un transfert rapide en clinique en cas de succès. L'épidémiologie a montré que la prééclampsie a des conséquences à long terme sur la santé des femmes. Le modèle murin permettra d'analyser finement l'impact moléculaire d'une prééclampsie sur le long terme.

11742 Certains axones du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP) sont enveloppés par des gaines de myéline. La myéline, produite par les oligodendrocytes dans le SNC et par les cellules de Schwann dans le SNP, est un isolant qui permet une conduction rapide du signal électrique et un support métabolique de l'axone. La perte de la myéline est à la base de certaines pathologies définies comme pathologies démyélinisantes. Une des pathologies démyélinisantes la mieux étudiées est la sclérose en plaques. Elle est caractérisée par la présence de plaques de démyélinisation et, dans les phases tardives de la maladie, par un épuisement des oligodendrocytes qui ne réussissent plus à former la myéline.

Bien que chez l'adulte un certain nombre d'oligodendrocytes restent sous forme de cellules précurseurs (OPCs) capables de se multiplier et de se différencier afin de reformer la myéline, ce mécanisme est inefficace dans la plupart des lésions de la sclérose en plaques dans sa forme chronique.

Il reste encore à comprendre quelles sont les raisons qui empêchent les oligodendrocytes de réparer le lieu endommagé. Il semble que l'un des facteurs cruciaux pour la remyélinisation soit l'équilibre prolifération/différenciation des OPCs. La plupart des cellules de l'organisme présente

une structure appelée cil primaire, laquelle attire de plus en plus l'attention de la communauté scientifique. Cet organite cellulaire est caractérisé par la présence de récepteurs et canaux spécifiques impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires pendant le développement et chez l'adulte.

Les études *in vitro* sur des cultures cellulaires d'OPCs ont permis de mettre en évidence la présence d'un cil primaire dans ces cellules et la modulation de sa longueur par le lithium. A l'heure actuelle, les connaissances sur la présence et la fonction du cil primaire des OPCs *in vivo* chez l'adulte sont inexistantes.

L'objectif du projet est de réaliser une cartographie des OPCs chez la souris adulte, de localiser le cil primaire en fonction du degré de maturité des OPCs en conditions physiologiques et après démyélinisation. Puis nous testerons l'effet du carbonate de lithium sur la remyélinisation dans un modèle murin de démyélinisation. Le carbonate de lithium est un médicament utilisé pour le traitement des troubles bipolaires, qui module le cil primaire *in vitro*.

En accord avec le principe de :

- Réduction : le nombre d'animaux utilisées est le minimum requis pour une analyse statistique, étant donné la variabilité interindividuelle suite à la procédure de démyélinisation – remyélinisation (environ 20% sur les paramètres évalués) ;
- Raffinement : afin de diminuer le stress, les animaux seront hébergés par groupes de 3-4 et auront accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Chaque cage sera enrichie avec du matériel pour la confection d'abris (coton, rubans de papier) ;
- Remplacement : la myélinisation – remyélinisation est un processus dynamique qui nécessite l'interaction entre la cellule myélinisante (l'oligodendrocyte) et l'axone du neurone dans un environnement cellulaire complexe impliquant les astrocytes et les cellules microgliales. Cet environnement ne peut pas, pour l'instant, être reproduit *in vitro*.

Approfondir les connaissances sur le fonctionnement des OPCs du cerveau adulte est un enjeu important, car le cil primaire, par sa capacité à concentrer des voies de signalisation importantes pour l'équilibre prolifération/différenciation, pourrait représenter une cible pour de nouveaux traitements. Ce projet implique l'utilisation de 600 souris adultes.

11743 L'agriculture est depuis toujours en constante évolution. Pour l'aider dans cette mutation la recherche agronomique a initié de nombreux programmes de recherche, auparavant orientés vers l'augmentation des performances et l'amélioration de la productivité des espèces animales élevées et destinées à produire du lait et/ou de la viande. Aujourd'hui, elle s'orienterait plutôt à maintenir le niveau de production des animaux (ovins, bovins) tout en prenant plus en compte les contraintes du milieu, les risques environnementaux (production des gaz à effet de serre, pollution des sols) ou attentes sociétales (bien être animal, qualité des produits, traçabilité de l'alimentation). Pour répondre à une partie de ces enjeux, notre établissement utilisateur a un besoin constant d'animaux. Pour réaliser des études fines des mécanismes physiologiques d'ingestion et de la digestion des aliments chez les ruminants, les animaux modèles utilisés sont, ici des bovins laitiers. C'est un modèle animal de référence pour établir les valeurs de digestibilité et d'ingestibilité des aliments pour ruminants, et pour comprendre les processus digestifs afin de les modéliser. Pour certaines études, en particulier pour la compréhension des mécanismes de digestion et de mesure de la cinétique de dégradation des aliments, le recours à des animaux porteurs de canules est indispensable. Le projet dure 5 ans et les expérimentations conduites nécessitent de disposer chaque année de 70 vaches laitières, dont 20 porteuses de canules, ainsi que leur descendance. Ceci implique de renouveler une partie de cet effectif chaque année. Il existe des méthodes alternatives de type *in vitro* mais dont la précision des résultats ne permet pas toujours la généralisation. Cependant, elles sont mises en oeuvre dès que possible permettant de remplacer ou de réduire au maximum le nombre d'animaux canulés utilisés et la sévérité des procédures appliquées.

La règle des 3R a été prise en compte pour l'élaboration du projet et de cette demande : i) recours à des méthodes *in vitro* si possible (cf ci-dessus) ; ii) raffinement des procédures expérimentales

pour réduire la douleur (antalgiques, anesthésiques, suivi post-opératoire), la souffrance et l'angoisse des animaux (habituation aux procédures, conditions d'hébergement et de contention adaptées, maintien du contact entre eux quand c'est possible, réduction du temps de présence en stalle de digestibilité, temps de repos suffisant entre les procédures appliquées et surveillance quotidienne de leur bonne santé) ; iii) schémas expérimentaux minimisant le nombre d'animaux : notamment approche en carré latin largement utilisée.

11744 30% des patients admis en réanimation présentent une infection sévère d'origine bactérienne (sepsis). Parmi ces patients le taux de mortalité est élevé. En effet, le sepsis peut évoluer en sepsis sévère et en choc septique avec défaillance d'organes et atteinte généralisée des muscles striés (altérations et destruction des fibres musculaires). A l'heure actuelle, la connaissance de la physiopathologie de ce syndrome reste incomplète et aucun traitement spécifique n'est disponible.

Le muscle strié squelettique est composé de différentes protéines. L'une des principales protéines contractiles de ce tissu est la myosine. La myosine ne possède pas de centre de symétrie et peut être observée avec une technologie de microscopie laser. Lorsque quatre images sont réalisées sur la même zone avec quatre orientations de la polarisation du laser exciteur, nous pouvons déterminer un paramètre angulaire de la myosine appelé paramètre Rho. Selon la littérature, ce paramètre pourrait être corrélé à l'état de contraction du muscle. Nous pensons que ce paramètre pourrait également être un indicateur de la capacité du muscle à se contracter et un potentiel élément prédictif précoce de l'altération musculaire en cas de sepsis.

Les objectifs de cette étude sont donc :

1/ D'effectuer les réglages du laser afin de travailler sur tissus frais

2/ De démontrer la corrélation entre contraction et modification du paramètre Rho sur fibres musculaires isolées

3/De caractériser les valeurs du paramètre Rho sur tissus frais sans sepsis et avec sepsis, dans des états contractés et relâchés

4/ De mettre en évidence une éventuelle corrélation entre modification des capacités contractiles du muscle *in vivo* et les modifications du paramètre Rho

L'objectif un nécessitera 10 animaux (rats Wistar), l'objectif deux 8 animaux, l'objectif trois 32 animaux et l'objectif quatre 32 animaux. Soit un total de 82 animaux sur deux ans.

Le laboratoire maîtrise déjà l'induction du sepsis chez le rat par la technique de ligature-perforation caecale. La technique de mesure de la contraction *in vivo* est également maîtrisée.

Les procédures sont établies dans le respect de la règle des 3R.

Réduction : Le nombre d'animaux a été optimisé afin de le limiter au maximum tout en s'assurant que les effectifs seront suffisants pour valider les hypothèses formulées.

Remplacement : Le projet porte sur l'étude d'un tissu biologique complexe et fonctionnel qui ne peut se faire sans l'utilisation de l'animal.

Raffinement : Toutes les mesures ont été prises pour limiter au maximum la souffrance de l'animal et respecter son bien-être. Une prise en charge antalgique systématique est prévue pendant toute la procédure. Par ailleurs, lors de leur stabulation, les animaux sont hébergés dans des conditions appropriées à leur espèce, avec enrichissement du milieu (tunnel) et visite au minimum quotidienne.

11745 Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation chronique et une production pathogénique d'auto-anticorps et de complexes immuns aboutissant à la dégradation de certains organes (reins, rate). Notre projet de recherche innovant a pour but d'étudier l'efficacité anti-inflammatoire d'un nouvel anticorps thérapeutique contre cette pathologie *in vivo*. L'amélioration des signes cliniques dans une souche murine développant de manière spontanée un lupus (MRL Fas lpr/WT), permettra à court terme de valider l'effet thérapeutique de la molécule de manière pré-clinique et de déterminer la toxicologie de notre agent thérapeutique pour à plus long terme, valider son utilisation chez les patients lupiques.

Les expérimentations animales ne peuvent pas être remplacées par des expérimentations *in vitro*. L'efficacité anti-inflammatoire de molécules nécessite une première validation chez des souris lupiques avant de pouvoir être vérifiée chez l'homme. Dans le but d'obtenir des statistiques fiables, le nombre de souris sera réduit à 280, d'une part pour observer les signes cliniques du lupus au cours du temps et d'autre part pour déterminer la concentration en molécule thérapeutique pour laquelle la physiopathologie est réduite voire inhibée sans être toxique pour l'animal. L'environnement des souris comportera divers enrichissements (roue, coton.).

11746 Ce projet vise à comprendre des facteurs qui pourraient améliorer le fonctionnement des circuits neuronaux dans un modèle de la maladie d'Alzheimer, pour changer la morphologie neuronale et améliorer l'apprentissage et la mémoire de ces animaux. Nous testerons les effets d'un traitement non-invasif, la Stimulation Transcrânienne Magnétique répétée (rTMS) à faible intensité (LI-rTMS, Low Intensity). Cette stimulation non-invasive applique des champs magnétiques au cerveau pour moduler l'excitabilité neuronale, mais sans activation électrique des neurones. Ce type de stimulation est déjà utilisé en clinique chez l'Homme pour des maladies neuropsychiatriques. Nous allons tester les effets de cette stimulation sur un modèle murin de la maladie d'Alzheimer pour trouver des traitements potentiels. A long-terme notre projet devrait permettre la mise en place d'interventions cliniques plus précises et plus efficaces pour des patients souffrants du déclin cognitif ou la maladie d'Alzheimer.

Dans la mesure du possible, le remplacement des animaux par des méthodes alternatives (modèles mathématiques, méthodes *in vitro* ...) est préféré. Mais le cerveau est une structure complexe avec de très nombreuses connexions, impossible à reproduire complètement en culture, et les modèles mathématiques ne permettent pas l'identification de protocoles de stimulation non invasive pour favoriser le bon fonctionnement des circuits neuronaux.

Le design des expériences comportementales a été étudié au plus juste. Nous avons ainsi réduit le nombre total d'animaux utilisés : en effet, des études antérieures ont montré que 15 animaux par groupe expérimental permettent de détecter un effet du traitement par des analyses statistiques (ANOVA, t-test) sur le comportement modifié grâce à ce traitement. Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés, nous étudions leur comportement avant de les euthanasier pour les analyses anatomiques, donc mettant au maximum l'usage de chaque animal.

Enfin, le raffinement des méthodes expérimentales afin de réduire à son maximum le stress des animaux est mise en œuvre. L'ensemble des expériences est mené par des personnels hautement qualifiés, et dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur.

Nous prévoyons 3 âges de souris différents (3 mois, 6 mois, 12 mois) et 15 animaux par âge, avec le même nombre de souris stimulées par LI-rTMS et souris sham. On utilisera un maximum de 90 souris.

11747 Le bar commun (*Dicentrarchus labrax*) est l'une des principales espèces de poissons marins d'intérêt aquacole en Europe. Un virus a été récemment isolé en cultures cellulaires à partir de poissons d'élevage juvéniles présentant des signes cliniques (gros ventres, tâches cutanées) mais pas de mortalité. L'expression clinique a été limitée à une fenêtre de développement précise, probablement associée à des cofacteurs qui restent à définir. Le virus, présent à une forte prévalence au sein de l'élevage touché, n'a pas pu être identifié avec les outils disponibles ciblant les principaux virus pathogènes connus des poissons. Différentes approches ont été utilisées pour le caractériser (séquençage complet, infections expérimentales, microscopie électronique,.) et ont permis de suspecter un genre viral particulier jamais décrit jusqu'alors chez cette espèce. Le risque commercial pour les pisciculteurs, notamment les écloséries, peut être très important avec l'impossibilité de vendre des alevins lors de la phase d'expression clinique de la maladie et une méconnaissance de l'évolution de l'infection et de la diffusion potentielle du virus après résolution des symptômes et vente des poissons.

L'objectif principal de ce projet est de déterminer la capacité de vaccins ADN (plasmides) contenant des fragments du génome de ce virus à induire une protection chez le bar commun.

Un total de 1300 juvéniles de bar sera utilisé pour réaliser la procédure expérimentale. Les poissons seront répartis en quatre lots qui recevront chacun un candidat vaccin différent, injecté par voie intramusculaire. Après 30 jours à 20°C, les individus seront contaminés par bain dans une eau contenant le virus produit en culture cellulaire. L'évaluation de l'efficacité vaccinale sera basée sur la réduction des signes cliniques potentiels et de la quantité de virus présents dans les poissons ainsi que sur la production d'anticorps spécifiques. Des témoins adaptés seront associés aux lots vaccinés et/ou soumis au virus d'épreuve.

La procédure sera menée dans le respect de la règle des 3R, à savoir tout d'abord la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique et le raffinement des conditions d'hébergement. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux (volume d'eau adapté avec renouvellement en continu, oxygénation suffisante, rythme jour/nuit naturel, présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche). Le remplacement n'est pas envisageable ; l'utilisation du bar étant nécessaire puisqu'il s'agit de la seule espèce cible décrite à ce jour pour ce virus.

11748 La rétinopathie diabétique (RD) est la cause principale de cécité affectant une population en âge de travailler. Cette pathologie affecte un nombre croissant de personnes. Dans sa forme proliférative, la RD se caractérise par l'apparition de néovaisseaux rétiens pouvant provoquer des hémorragies et entraîner une perte d'acuité visuelle rapide et définitive. Il est donc essentiel de comprendre les mécanismes d'apparition de ces néovaisseaux afin d'identifier de futures cibles thérapeutiques et permettre aux patients atteints de RD de conserver leur vue. Des études de l'équipe ont permis d'identifier des substances qui joueraient un rôle essentiel dans les mécanismes d'apparition des néovaisseaux de la rétine (cytokines, interleukines...). Nous voulons étudier dans ce projet l'influence de ces substances sur un modèle murin de rétinopathie diabétique et évaluer l'efficacité d'inhibiteur de ces substances dans le traitement de la RD. Il est reconnu par la communauté scientifique que la surexposition de souriceaux à un fort taux d'oxygène permet d'obtenir un modèle de RD.

Nous injecterons donc en intraoculaire les substances identifiées à ces souriceaux. Une quinzaine de substances seront testées. Au total, 152 portées de 6 souriceaux et leurs mères seront nécessaires à notre étude. Une de nos procédures expérimentales nécessitera l'utilisation de mères adoptantes (n=152) soit un total de 1216 animaux pour ce projet. Les études histologiques et biochimiques de l'effet des substances se feront après euthanasie de l'animal.

Les études préliminaires *in vitro* ont déjà été réalisées. L'utilisation de l'animal est indispensable à ce stade du projet ; l'étude de l'influence de ces substances sur le réseau vasculaire de la rétine dans son ensemble ne peut être réalisé que sur le vivant. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie et seront hébergées dans les conditions conformes à la réglementation. Les animaux bénéficieront si besoin d'une anesthésie gazeuse pour les injections intraoculaires. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien-être.

11749 Les traitements conventionnels contre le cancer, comme radiothérapie et chimiothérapie, ont une action destructrice directe sur les cellules cancéreuses mais également sur les cellules saines. Pour cette raison, des thérapies ciblées, comme les inhibiteurs de kinases, capables de détruire seulement les cellules tumorales ont été développées. Mais, ils ne préviennent pas du risque de récurrence. Notre laboratoire travaille sur la capacité des traitements anticancéreux à activer le système immunitaire, qui peut reconnaître et détruire les cellules tumorales à leur apparition, évitant le risque de récurrence. Des données récentes ont permis d'identifier les inhibiteurs de la tyrosine kinase ALK (Anaplastic lymphoma kinase), responsable du lymphome pédiatrique anaplastique à grandes cellules (ALCL). Le but de ce projet consiste à évaluer comment ces traitements peuvent activer le système immunitaire dans le lymphome pédiatrique anaplastique à grandes cellules. Cette

question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale dans des systèmes *in vitro*. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris immunocompétentes (n=1920) et immunodéficientes (n=960), accessibles dans le commerce et qui présentent un phénotype complètement normal. Ce projet se dessine sur 5 ans et implique des expériences de croissance tumorale. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum* ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Ce projet vise à l'étude du rôle du système immunitaire suite à l'utilisation de médicaments anti-cancéreux inducteurs de mort cellulaire immunogène, afin d'orienter le choix vers les meilleures stratégies thérapeutiques chez les jeunes patientes atteintes du lymphome anaplasique à grandes cellules.

11750 Projet : Test d'un vaccin thérapeutique antitumoral contenant de la télomérase recombinante.

Depuis les premiers succès de l'immunothérapie antitumorale, le secteur de la vaccination antitumorale est actuellement en plein regain de développement. En effet, les principaux traitements d'immunothérapie actuels permettent d'accroître/restaurer la réponse immune spontanée qui préexiste dans les cas où la tumeur est attaquée par le système immunitaire. Toutefois, pour la grande majorité des patients, les traitements d'immunothérapie actuels restent inefficaces parce que le système immunitaire n'induit pas spontanément une réponse élevée contre la tumeur. Une intervention (une vaccination thérapeutique) est nécessaire pour stimuler le système immunitaire et lui apprendre à rejeter la tumeur comme un corps étranger. La télomérase est réactivée dans 90% des cancers chez l'homme et peut servir de cible reconnue par le système immunitaire. La première génération de vaccin télomérase était suboptimale et a donné des résultats modestes en clinique. Aussi, il existe un fort besoin de développer un vaccin optimal contre la télomérase.

Les souris utilisées dans le cadre de notre projet permettront d'étudier l'efficacité d'un nouveau vaccin thérapeutique anti tumoral dirigé contre la télomérase avant son essai chez l'homme.

Type d'animaux : Souris commerciale non transgénique C57BL/6j.

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 528 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrits au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement tumoral. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu. Nous avons choisi le modèle souris pour sa simplicité de mise en œuvre et car ce modèle a déjà été utilisé pour l'étude préclinique d'un vaccin thérapeutique contre la télomérase actuellement testé en essai clinique aux USA chez l'homme.

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

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

11751 De nombreuses situations pathologiques mènent à une perte de muscle importante qui a pour conséquences une perte d'autonomie, des retards de récupération, et à terme des coûts de prise en charge élevés. Notre objectif répond à un enjeu majeur de santé publique : Développer des stratégies d'intervention pour préserver la masse musculaire et améliorer la récupération.

Le métabolisme protéique intestinal et musculaire sont intimement liés. Nos données préliminaires suggèrent fortement que la priorité doit être donnée à l'intestin pour permettre une récupération optimale au niveau musculaire. En d'autres termes, le muscle squelettique ne peut initier sa récupération de façon efficace que si l'intestin a déjà récupéré. Nous avons montré que l'administration d'une hormone gastrointestinale en amont d'un jeûne avait permis non seulement de préserver l'intestin, mais également d'accélérer la récupération intestinale et musculaire au moment de la renutrition. Cependant, les mécanismes à l'origine de cet effet bénéfique ne sont pas connus. De plus, les événements de la vie n'étant pas tous prédictibles, l'intérêt de l'utilisation de cette hormone gastrointestinale serait d'autant plus important si son effet bénéfique existe également lorsqu'administré une fois la situation catabolique déclarée.

Nos objectifs sont donc 1) d'identifier les mécanismes par lesquels cette hormone administrée en préventif exerce son effet bénéfique sur l'amélioration de la récupération musculaire suite à un jeûne et 2) de déterminer si cet effet bénéfique sur la récupération musculaire existe également lorsqu'elle est administrée au moment de la renutrition après le jeûne.

La fonction musculaire sera évaluée par la mesure de la masse et du métabolisme protéique musculaire ainsi que les paramètres (e.g. voies de signalisation) qui le contrôlent. Nous mesurerons également les taux circulants en acides aminés pour évaluer leur utilisation par les viscères et leur disponibilité pour les muscles.

Nous estimons que 640 rats au maximum seront nécessaires pour mener à bien cette étude sur 5 ans. Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) en accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE seront les suivantes :

- Remplacer : Nous étudions les effets de différents niveaux de contraintes environnementales sur la physiologie du système musculaire. Les expérimentations animales avec système intégré sont donc primordiales. Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier, telles que les adaptations intestinales, peuvent influencer la cinétique de perte musculaire. Nous avons choisi le rat comme modèle animal car il permet de mettre en place des modèles d'étude pertinents pour la physiologie musculaire de par sa proximité en termes d'adaptation métabolique au niveau musculaire lors de situations cataboliques. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

- Réduire : Nous avons prévu le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux différentes questions scientifiques, garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et palier l'exclusion de certains rats dans l'expérimentation. Ce nombre d'animaux maximal sera revu à la baisse quand les résultats obtenus ne nécessiteront pas de répétitions pour valider les observations.

- Raffiner : Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. i) les animaux seront adaptés à leur environnement avant les expérimentations. ii) un suivi quotidien (poids corporel, prise alimentaire) des animaux sera réalisé et sera bi-quotidien pendant le jeûne et/ou l'administration de l'hormone. iii) Des points limites ont été définis pour identifier rapidement tout signe de souffrance éventuel ou perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial). Dans ce cas, l'animal sera retiré des procédures

expérimentales et euthanasié si les signes persistent dans les 24h. Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi pour améliorer les conditions d'hébergement.

11752 L'obésité dans la population humaine est un problème de santé publique en évolution rapide au niveau mondial : le nombre de personnes obèses, c'est à dire dont l'indice de masse corporelle est supérieur à 30 (kg/m²) est ainsi passé entre 1975 et 2014 de 3,2 à 10,8% pour les hommes et de 6,4 à 14,9% pour les femmes. L'obésité est reliée à des diabètes de type 2 et des maladies cardiovasculaires dans l'espèce humaine. Une évolution similaire est observée chez les chiens et les chats, dans leur cas, ceci n'est pas dû aux mêmes causes, essentiellement alimentaires, que chez l'Homme mais plutôt à une sédentarité urbaine croissante sans réduction de la prise alimentaire. Les traitements actuels consistent en des régimes hypocaloriques et en des chirurgies bariatriques, tous deux assortis d'effets néfastes, les effets rebonds en fin de régime ou l'inobservance en raison d'une faim persistante pour les régimes et en complications post-opératoires pour les chirurgies de réduction gastrique.

Le présent projet consiste à évaluer l'efficacité et la sécurité d'une préparation qui, en se gélifiant, assure un remplissage neutre gastrique partiel (a priori 1/3 du volume alimentaire normalement ingéré) suivant son administration orale sur la prise alimentaire volontaire de chiens traités. Le projet comporte trois étapes incluant chacune 4 chiens, soit 12 animaux au total ou 4, si, après une période de wash-out, le comportement alimentaire des animaux retrouve son état initial ce qui permet d'inclure les mêmes animaux dans les différentes phases.

La première phase consiste à vérifier que l'administration du produit prévue sous forme liquide 10 minutes avant le repas est effectivement applicable dans cette espèce. Cette phase est prévue sur 5 jours.

La seconde phase consiste à identifier si les effets indésirables possibles (diarrhée, vomissement, confort de l'animal) peuvent être observés après une administration unique. Cette phase peut éventuellement être passée si aucun effet indésirable n'est observé durant la première phase de faisabilité.

La dernière phase consiste à mesurer l'efficacité d'une administration quotidienne préalable au repas pendant 15 jours sur une réduction de la quantité d'aliment absorbée et sur la masse corporelle. A l'issue de cette phase, un bilan biochimique sera réalisé et comparé à l'état biochimique avant le début de la première phase.

Le volume du produit plongé dans une solution à l'acidité équivalente à celle de l'estomac d'un chien a été évalué *in vitro*. Toutefois, avant tout essai sur des patients humains ou des animaux obèses dans le cadre d'un essai clinique, la faisabilité, l'innocuité et l'efficacité doivent être testées sur des animaux. Nous estimons que les effets indésirables de la présence du produit dans l'estomac sont improbables, toutefois, si des signes généraux devaient se produire de manière flagrante et répétée, l'essai serait interrompu. Le nombre d'animaux, de 4 par phase de test est aussi réduit qu'il nous semble possible de le faire : il permet de détecter une inefficacité ou une intolérance partielle de l'ordre de 25%.

11753 Projet : La cholangite sclérosante primitive (CSP) est une maladie biliaire fibrosante pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement médical. Jusqu'à présent, il n'a pas été possible de proposer d'intervention médicale ciblée, essentiellement car les mécanismes physiopathologiques de la CSP restent mal connus. Dans ce contexte, il est particulièrement important d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles.

L'objectif de notre projet est de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'activation du récepteur membranaire des acides biliaires, TGR5, a un rôle protecteur dans la CSP.

Pour vérifier cette hypothèse, nous étudierons l'effet d'un agoniste de TGR5 dans le modèle murin le mieux établi de CSP, les souris invalidées pour Abcb4.

Type d'animaux : Souris commerciales de différents fonds génétiques (FVB/n, Balb/c ou C57BL/6j) et transgénique modèle de CSP (Abcb4^{-/-}).

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 192 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

11754 Les coccidioses des volailles sont des affections très fréquentes dues à des parasites du genre *Eimeria*. Elles ont des conséquences économiques et sanitaires importantes, notamment dans les élevages de poulets (*Gallus gallus*). Si des mesures d'hygiène rigoureuse peuvent réduire le risque, elles sont le plus souvent insuffisantes. Les approches vaccinales sont coûteuses et parfois difficiles à mettre en œuvre correctement. Les approches préventives par usage d'anticoccidiens dans l'aliment sont donc d'usage très courant et peuvent conduire à l'émergence de résistance chez les coccidies, réduisant l'intérêt et l'efficacité de ces molécules. Selon la recommandation de la Commission Européenne, le développement et l'évaluation d'alternatives aux méthodes existantes sont nécessaires. Le but de cette étude est d'évaluer des produits susceptibles d'enrichir les moyens de lutte contre les coccidioses, dans un modèle de reproduction expérimentale de la coccidiose chez le poulet.

Dans l'état actuel des connaissances, l'évaluation de l'activité anticoccidienne repose uniquement sur la comparaison des performances de croissance et la description des lésions intestinales, d'où la nécessité d'utiliser les oiseaux dans un modèle d'infection expérimentale. En raison d'une durée de vie limitée des oocystes (forme de résistance du parasite à l'origine de l'infection des oiseaux), la multiplication sur oiseaux pour produire de nouvelles générations de parasites indispensables à toute étape d'évaluation de solutions alternatives reste la seule méthode permettant de disposer de parasites frais et en quantités suffisantes.

Pendant les 5 années du programme et pour toute la procédure de multiplication, 480 poulets au maximum, recevront des doses faibles permettant de multiplier les parasites sans entraîner de symptômes ou douleurs.

Pour les souches de coccidies collectées du terrain, une évaluation de leur capacité à provoquer la maladie est réalisée afin de déterminer le nombre d'oocystes à inoculer aux oiseaux pour reproduire une coccidiose clinique modérée. Ainsi, durant cette phase, 1000 poulets au maximum recevront des doses croissantes de coccidies afin de déterminer cette dose maximale d'oocystes à utiliser.

Enfin, sur les 5 années du programme, au maximum 7600 oiseaux seront inoculés avec le nombre d'oocystes le plus faible pour reproduire une coccidiose modérée (affectation légère du comportement et diarrhée modérée ne durant pas plus de 2 à 3 jours et régressant spontanément) afin d'évaluer des solutions alternatives aux anticoccidiens actuels.

Au final, ce projet permettra sur 5 ans d'évaluer près de 60 solutions alternatives, à base d'extraits végétaux, d'huiles essentielles, etc, permettant de proposer de nouveaux moyens de lutte contre la coccidiose du poulet. Ce projet permettra aussi d'évaluer l'évolution du pouvoir infectieux des souches isolées du terrain et la mise en évidence d'éventuelles résistances aux anticoccidiens actuels.

Au total, sur 5 ans, au maximum 9080 poussins obtenus auprès de couvoirs conventionnels et élevés par lots successifs seront utilisés pour l'ensemble des trois procédures.

Tous les efforts en vue de réduire le nombre d'animaux seront entrepris lors des différentes expérimentations. Ainsi, pour la procédure de multiplication des coccidies, pour les espèces les plus prolifiques, le nombre d'oiseaux pourra être inférieur à 12. Pour la procédure d'évaluation des moyens de contrôle, l'effectif a été calculé sur la base d'essais antérieurs pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en permettant de tester un nombre élevé de produits à chaque expérimentation. De plus, pour cette dernière procédure, tous les animaux élevés et non sélectionnés pour l'inclusion dans le dispositif expérimental seront dès que possible utilisés dans les procédures de multiplication et d'évaluation du pouvoir pathogène afin d'en limiter le nombre.

Les procédures ne devraient être à l'origine d'aucune souffrance. Les doses d'oocystes permettront de reproduire un épisode de coccidiose avec des signes cliniques transitoires, ne dépassant pas les limites de tolérance établies, sans quoi une euthanasie compassionnelle sera réalisée.

De nouvelles cages installées en 2017 permettent un meilleur raffinement dans l'hébergement, tel que la mise en place de perchoirs et de mobiles dans les cages, en plus d'un éclairage naturel respectant le rythme circadien des oiseaux.

11755 La gourme est une maladie bactérienne très contagieuse. La bactérie responsable de cette infection est *Streptococcus equi equi*. Elle se transmet par contact direct avec des sécrétions nasales, oculaires ou provenant de nœuds lymphatiques abcédés, voire indirectement par contact avec un milieu (écurie, pâturage, eau de boisson...) ou matériel (seaux, brosses...) contaminés. Souvent considérée comme banale et classiquement associée à un tableau clinique respiratoire, les professionnels oublient qu'elle peut provoquer des abcès purulents et que, dans les formes les plus graves, elle peut être mortelle pour les chevaux. De plus, malgré la disponibilité de nombreux tests diagnostiques, il n'existe pas de consensus sur l'utilisation de telle ou telle méthode en fonction des différentes phases de la maladie : cheval indemne, porteur asymptomatique ou malade.

Afin de mieux comprendre et appréhender cette infection bactérienne du cheval, le projet Gourme a été construit sous forme de 3 actions :

1. Déterminer le test diagnostique le plus performant (ELISA et/ou PCR) à réaliser pour confirmer le statut d'un cheval vis-à-vis de la gourme.
2. Caractériser les souches issues de l'étude de terrain, afin de comprendre les particularités des souches isolées en France en comparaison des autres souches isolées dans le monde.
3. Proposer un protocole de gestion sanitaire de la gourme et suivre son application jusqu'à l'éradication de la maladie dans des élevages atteints.

Ce projet Gourme respecte la règle des 3R :

L'étude terrain de l'action 1 a été conçue pour réduire le nombre d'animaux par groupe afin de garantir une puissance statistique représentative des résultats obtenus. Le nombre de prélèvements par groupe a également été réduit à son minimum (Réduction).

La comparaison des méthodes de diagnostic (PCR, Sérologie, Bactériologie) et la nature des prélèvements (Ecouvillon naso-pharyngé et lavage de poches gutturales) proposée dans l'action 1 de cette étude, devrait aboutir à l'identification des méthodes les plus sensibles ainsi que des prélèvements les plus appropriés (Raffinement des méthodes diagnostic et des prélèvements). Ce qui permettra de réduire à terme le risque des résultats faussement négatifs et donc la nécessité de répéter les prélèvements (Réduction). L'identification des porteurs sains par des méthodes sérologiques peut à terme remplacer la réalisation des poches gutturales et donc réduire le

caractère invasif des procédures nécessaires pour identifier les porteurs sains de la gourme (Remplacement).

Afin d'augmenter la représentativité des résultats obtenus au sein du groupe Contrôle, plusieurs cohortes de taille limitée (20 ponettes liées à cette présente demande) seront combinées, ce qui devrait réduire le besoin de répéter cette étude dans le futur (réduction/raffinement).

Tous les échantillons seront conservés en bio-banques et pourront être utilisés dans d'autres travaux réduisant le besoin d'effectuer de nouveaux prélèvements biologiques (Réduction).

Les ponettes utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance continue et hébergées dans une stabulation sur une aire paillée répondant aux enjeux du bien-être animal chez cette espèce (accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, accès à une brosse latérale) de plus les animaux auront un accès à une pâture (Raffinement).

11756 Le virus de la diarrhée épidémique porcine (DEP) provoque d'importantes diarrhées, des vomissements et des déshydratations chez les porcs atteints. Ce virus (PEDV) s'est propagé depuis les années 1970 et est resté endémique dans certains pays européens. En 2013, une épizootie (épidémie frappant les animaux) très sévère de DEP est apparue aux Etats-Unis provoquant la perte de 7 millions de porcelets en moins d'un an. La maladie s'est propagée à travers tout le pays puis au Canada ainsi qu'en Amérique du Sud. Elle est toujours d'actualité et sa rapidité de propagation motive une vigilance accrue à l'égard de cette maladie en Europe. Les cas de DEP aux Etats-Unis ont permis d'isoler deux types de souches : des souches dites INDEL (insertions et délétions dans le gène S) et des souches dites non INDEL qualifiées de plus virulentes. Les souches INDEL sont proches des souches européennes alors que les souches non INDEL sont de nouveaux variants présentant des mutations génétiques. Malgré les études réalisées sur ce virus, des incertitudes sur l'infectiosité de semences contaminées par le PEDV et sur la transmission via l'air des différents types de souches de PEDV subsistent. Ce projet sur la détermination de l'infectiosité de semences contaminées par le PEDV et de la capacité de transmission du PEDV via l'air vise donc à amener des connaissances sur la possibilité de transmission de ces deux types de souches virales via les semences et l'air. Le porc étant l'espèce cible et aucune méthode alternative n'étant disponible ce projet nécessite le recours à l'expérimentation animale. Une procédure expérimentale sera réalisée sur 18 porcs EOPS (Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques). Elle permettra d'évaluer la transmission du PEDV via les semences et l'air selon le type de souche étudiée (INDEL ou non INDEL). Les porcs témoins seront réutilisés dans les deux essais. Au cours de ces essais, des prélèvements réguliers de sang et de fèces seront effectués. Les résultats ainsi obtenus permettront de déterminer la présence de particules virales dans les fèces, la durée de l'excrétion ainsi que de la virémie. Le nombre d'animaux utilisés (18 porcs EOPS) est le plus faible possible tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement robustes. Des points limites seront précisément définis pour que les animaux soient euthanasiés avant que la souffrance n'ait atteint un seuil non acceptable. Les porcs seront logés en groupe dans des parcs équipés de matériaux manipulables. Les conditions d'hébergement limitant l'angoisse potentielle des animaux seront respectés (respect des densités, eau et nourriture à volonté, enrichissements adaptés,...).

11757 La cornée est la membrane transparente située en avant de l'œil. Elle est constituée de plusieurs couches : l'épithélium qui constitue la couche la plus externe, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium (la couche la plus interne). Lorsqu'elle devient opaque ou trop déformée, l'œil devient non voyant et il est nécessaire de réaliser une greffe de cornée, soit sur toute son épaisseur, soit sur une partie de son épaisseur. Habituellement, son remplacement est réalisé à l'aide d'un greffon cornéen provenant d'un donneur humain lors d'une allogreffe de cornée. Cependant le nombre de cornées disponibles pour la greffe reste limité, en particulier dans certains pays. Dans le but de surmonter cette limitation, d'autres méthodes alternatives sont mises en place.

Le but de notre projet est d'évaluer la possibilité de remplacer une partie du stroma cornéen par des lenticules de collagène (stroma profond) et par des fragments de membrane amniotique lyophilisés (surface de la cornée). Notre équipe a pu bénéficier de la mise au point de lenticules de collagène

dont la consistance, la tenue, et la ré-épithélialisation *in vitro* paraissent très intéressantes pour une utilisation dans la cornée. Nous travaillons également sur la lyophilisation des membranes amniotiques qui ont des propriétés physicochimiques et biologiques puissantes pour la cicatrisation de la surface de la cornée. Le mode de conservation actuel de la membrane amniotique en France est la congélation, ce qui en limite la diffusion à l'inverse de la lyophilisation que nous souhaitons développer.

Dans le cadre du remplacement les résultats obtenus préalablement *in vitro* (culture cellulaire et analyse protéomiques) de la comparaison des deux méthodes de conservation de la membrane amniotique démontrent des résultats satisfaisants. Ainsi la recette optimum de lyophilisation a été mise en place. Cependant les analyses *in vitro* ne permettent pas d'évaluer tous les paramètres qui confirmeront la bonne intégration et la biocompatibilité de ces matériaux. Le but affiché est de pouvoir utiliser ces biomatériaux chez l'homme et pour cela une démarche d'étude de la compatibilité préalable sur la cornée animale est tout à fait indispensable.

La dimension de la cornée du lapin est proche de celle de l'homme, cela permet une insertion plus facile du biomatériau par le chirurgien.

Dans le cadre de la réduction nous utiliserons le nombre minimal d'animaux afin de rester statique : Deux procédures différentes seront pratiquées :

L'évaluation de la biocompatibilité des lentilles de collagène sur 12 lapins opérés d'un seul œil. 6 lapins seront opérés pour une implantation de lentille dans l'épaisseur du stroma cornéen (INLAY) et 6 autres seront opérés pour une implantation de lentille à la surface du stroma cornéen (OVERLAY).

L'évaluation de la biocompatibilité des membranes amniotiques lyophilisées nécessite un groupe de 18 lapins également opérés d'un seul œil. Pour pouvoir comparer les résultats entre les différents groupes de lapins il est nécessaire d'avoir 6 lapins par groupe. 6 lapins recevront une greffe de la membrane amniotique lyophilisée, 6 lapins une greffe de la membrane amniotique congelée et 6 autres ne recevront pas de greffe (groupe contrôle).

Le total d'animaux utilisés sera de 30 lapins.

Dans le cadre du raffinement toutes les procédures seront effectuées sous anesthésie générale et locale. Un suivi et un traitement antalgique poste opératoire sera effectué pendant une période de 3 semaines. Des jouets plastiques seront disposés dans la cage afin d'assurer l'enrichissement du milieu. Pour garder une bonne qualité de vue, un seul des deux yeux sera opéré.

L'anesthésie générale : isoflurane 5% pour l'induction et 2.5% pour le maintien dans de l'air comprimé du fait de la courte durée de l'anesthésie.

Anesthésie locale : collyre de chlorhydrate d'oxybuprocaine.

Antalgique poste opératoire : Injection intravitréenne d'acétonide de triamcinolone (Kenacort Retard 40mg/mL) fin de l'opération et par la suite pommade ophtalmique anti-inflammatoire (sterdex) à raison de deux fois par jour.

L'objectif de ce projet de recherche est double : d'une part, évaluer la biocompatibilité ainsi que la transparence au sein de la cornée de lentilles de collagène réticulé ; d'autre part évaluer la capacité d'intégration et de ré-épithélialisation de fragments de membrane amniotique lyophilisés dans la cornée de lapin. L'objectif principal de ce projet de développer l'application clinique de ces greffes chez l'humain.

- 11758** L'obésité est souvent associée au développement de la maladie du foie gras et d'une perturbation du métabolisme des graisses appelée dyslipidémie. Cette dyslipidémie est essentiellement caractérisée par une augmentation du nombre et une baisse de la qualité des lipoprotéines de faible densité (LDL-c) communément appelé « mauvais cholestérol ». En parallèle, on observe généralement une augmentation modérée des triglycérides (TG) plasmatiques et une diminution du taux de HDL-cholestérol (souvent appelé « bon cholestérol »). Cette dyslipidémie représente le principal facteur de risque des maladies cardiovasculaires. Toutefois, la compréhension des mécanismes et leurs implications sont encore loin d'être élucidées.

Notre équipe possède une expertise et un intérêt reconnu pour l'étude du métabolisme des graisses dans le foie au cours de l'obésité et plus particulièrement pour les nombreux troubles liés à la production et l'accumulation de LDL-c. Même si à ce jour de nombreuses approches permettent de réduire les taux de « mauvais cholestérol », aucun traitement pharmacologique ne donne entière satisfaction concernant les capacités à réduire le risque cardio-vasculaire à long terme. C'est pourquoi il est nécessaire d'explorer de nouveaux mécanismes afin de développer à terme de nouveaux agents thérapeutiques. Parmi ces cibles potentielles, le système endocannabinoïde (SEC) et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) ont retenu notre attention.

Le SEC est un système biologique complexe mettant en jeu des molécules analogues à celles trouvées dans le cannabis et est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques. Ce système est essentiellement composé de 2 récepteurs (CB1R et CB2R) et de 2 molécules produites par l'organisme appelées endocannabinoïdes. Notre intérêt pour le SEC et les CB1R en particulier fait suite aux études montrant qu'une activation de ces récepteurs au niveau pancréatique conduit à une destruction ou une perte de fonction des cellules responsables de la production d'insuline, favorisant ainsi le développement du diabète. Inversement son blocage avec un agent pharmacologique semble partiellement corriger ces effets.

L'enzyme iNOS quant à elle voit son activité augmentée au cours de l'obésité et semble diminuer l'action de l'insuline dans le métabolisme du glucose en produisant des quantités anormales de monoxyde d'azote. De plus, l'activation de cette enzyme favorise également le développement de la maladie du foie gras et de fibrose.

Ainsi, notre objectif consiste à déterminer si le blocage simultané de CB1R et d'iNOS pourrait être une stratégie thérapeutique efficace pour lutter contre l'obésité, la maladie du foie gras et ses modifications dans le métabolisme des graisses. Pour cela, nous disposons d'un agent pharmacologique hybride (MRI-1867) présentant la double capacité de bloquer les CB1R et d'inhiber l'activité de l'enzyme iNOS. Nous souhaitons donc tester cette molécule sur ces différents aspects.

L'utilisation du modèle animal (souris) s'impose dans ce projet d'une part du fait de l'absence d'outils pharmacologiques validés par l'agence européenne des médicaments (EMA) qui auraient pu permettre la mise en place d'une étude clinique et d'autre part par le besoin d'analyser les mécanismes fondamentaux impliqués dans cette pathologie multifactorielle. De plus, Il n'est pas possible d'étudier tous ces aspects et mécanismes impliquant des échanges entre les organes en se limitant à des approches *in vitro*.

Ainsi, nous utiliserons 460 souris mâles adultes (C57BL6J et Balb/c) qui seront soumises soit à un régime alimentaire standard, soit à un régime alimentaire enrichi en graisse (de l'ordre de 60%) afin d'induire une obésité.

Nous utiliserons des souris mâles, car il est connu que les souris femelles sont moins susceptibles de développer une obésité suite à un régime riche en gras. Cependant, dans un souci de réduction et en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrit au 2^o paragraphe de l'article R214-105 « règle des 3R », les souris femelles issues des croisements des différents élevages pourront être utilisées pour étudier les cellules primaires du foie *in vitro*, ainsi que pour la mise au point de certaines techniques.

Pour enrichir le milieu, tous les animaux auront à leur disposition des carrés de cellulose, une maisonnette et des bâtons à ronger.

De plus, aucune procédure incluse dans ce projet ne doit induire de douleur ou de souffrance chez l'animal. Ainsi, aucune anesthésie ou traitement avec un agent antidouleur n'est nécessaire. Cependant, un choc hypoglycémique peut apparaître lors du test de tolérance à l'insuline. Si cela arrive, les animaux recevront immédiatement un bolus de glucose et seront placés sur un tapis chauffant afin d'éviter une hypothermie caractéristique de ce phénomène. Enfin, si malgré toute notre attention, des signes de souffrances sont observés, les animaux auront accès à un traitement antalgique afin de les soulager.

Le nombre d'animaux utilisé a été réduit au minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. Nous avons également

limité au maximum l'utilisation d'animaux pour les études mécanistiques en complétant cette approche par l'utilisation d'une approche *in vitro*. En outre, le jour de chaque expérimentation, les souris seront manipulées par des expérimentateurs titulaires du niveau B.

D'autre part, bien que notre intérêt principal concerne le métabolisme des graisses dans le foie, nous nous efforcerons de collecter tous les autres tissus métaboliques des animaux afin de mettre en place une banque d'organe nous permettant de mutualiser les échantillons et ainsi réduire le nombre d'animaux nécessaire pour de futurs projets ou des projets collaboratifs.

Nous espérons que ces travaux permettront de mieux comprendre le rôle du SEC/iNOS dans les perturbations du métabolisme des graisses associées à l'obésité. Nous pensons que ce projet nous permettra également de mieux appréhender le rôle du SEC/iNOS dans le contexte de l'inflammation associée à l'obésité et à la résistance à l'insuline. Enfin, nos résultats pourraient conduire à l'élaboration de futures stratégies thérapeutiques pour le traitement des pathologies associées à l'obésité.

11759 L'apprentissage de la chirurgie pour les futurs médecins se fait d'abord sur pièces anatomiques puis par parrainage progressif au bloc. Cependant, ce parrainage a ses limites notamment pour l'enseignement à de nouvelles pratiques ou à la manipulation de nouveaux matériels. La coelochirurgie ou chirurgie par endoscopie est une technique en constante évolution et elle demande un training conséquent avant de maîtriser correctement l'abord et la gestuelle. Une partie de cet apprentissage se fait *ex vivo* dans des boîtes appelées « coelio trainer » notamment pour la manipulation des outils (pinces, ciseaux, coagulateurs etc...) et leur contrôle sur écran.

Les cours théoriques puis l'entraînement sur l'animal sont destinés à diminuer la courbe d'apprentissage nécessaire à chaque intervention de coelochirurgie. Les indications reconnues pour les différentes disciplines sont exposées. De même l'introduction des trocars, la création du pneumopéritoine (insufflation de dioxyde de carbone dans la cavité abdominale pour mieux visualiser les organes et les isoler de la paroi), l'exposition c'est-à-dire la manipulation correcte des organes, la qualité de l'image, la gestuelle sont détaillés pour éviter les accidents dus au non respect des principes de base. La pratique chirurgicale correcte (respect des tissus, contrôle de l'hémostase, techniques de suture etc.) nécessite absolument un entraînement *in vivo* : les pièces anatomiques ne suffisent pas à enseigner la tension des tissus et organes, la fragilité vasculaire ou des parois. Le passage sur organisme vivant est indispensable et il est souhaitable que cet entraînement soit effectif avant la présence en bloc hospitalier, ce qui justifie cette phase préliminaire sur animal.

Pour réduire le nombre d'animaux, les stagiaires travaillent par groupe de deux ou trois pour un même animal. L'espèce choisie est le porc de par ses similarités anatomiques et physiologiques avec l'Homme. L'animal est endormi environ 8 heures : un côté est opéré le matin puis l'animal est retourné pour permettre une deuxième intervention sur l'autre côté.

Les animaux sont hébergés en groupes sociaux (même portée élevée ensemble), dans des cases chauffées et sur paille pour que les animaux puissent fouir et jouer (enrichissement du milieu). Le matin de l'intervention, les animaux sont anesthésiés, l'anesthésie générale étant maintenue toute la journée. Il n'y a pas de réveil des animaux, l'euthanasie par surdosage barbiturique se déroule sous anesthésie. Les animaux ne sont pas réveillés car les chirurgies réalisées en entraînement impliquent des exérèses d'organes vitaux (reins par exemple).

Le nombre total d'animaux par an est de 24 porcs (12 porcs par semaine, sur deux sessions de 4 journées pratiques) soit 120 porcs au total sur les 5 ans.

11760 La thérapie génique a démontré son efficacité chez l'homme mais uniquement en utilisant des virus pour introduire le gène thérapeutique dans les cellules. L'utilisation des virus recombinants pose cependant encore des problèmes de production, de coût et d'éthique. Le but du présent projet est de démontrer que la vectorisation de plasmides ADN pour la thérapie génique par des vecteurs chimiques, notamment des polymères cationiques – permet un transfert de gènes efficace chez la souris. Un nouveau système de formulation entre un polymère cationique et un plasmide ADN a été

développé et breveté. Il permet la formation de très petites particules (polyplexes ; PX) de 30 nm de diamètre, ce qui constitue une avancée remarquable car les techniques actuelles ne permettent de former des particules ayant taille > 100 nm qui ne sont pas très efficaces du fait de leur élimination rapide de la circulation et de leur faible pénétration dans le noyau des cellules. Ces nouvelles particules sont donc particulièrement mieux adaptées pour les injections par la voie sanguine. Des polymères permettant le ciblage d'un tissu tel que les muscles squelettiques seront utilisés. Pour cela, le recours à l'animal est indispensable en l'occurrence la souris. Les nanoparticules PX contiendront le gène rapporteur de la luciférase. Les injections seront réalisées par la voie sanguine au niveau de la queue des souris. L'objectif des expériences de bioluminescence sur le petit animal est de valider ces nouvelles particules en termes d'efficacité de transfection et de spécificité de délivrance via des éléments de ciblage. Les expériences seront réalisées avec des souris mdx modèle murin pour la dystrophie de Duchenne et des souris saines contrôle soit un total de 344 souris. Les travaux seront menés selon la règle des 3R : des approches par imagerie *in vivo* nous permettront de réduire la souffrance de nos animaux (Raffiner) et de Réduire leur nombre au minimum grâce à la possibilité d'un suivi longitudinal.

Les travaux seront menés sur souris saines et nous n'attendons pas de dommages particuliers. Une surveillance pointue des animaux sera mise en œuvre et des points limites ont été déterminés afin d'anticiper toute souffrance qui apparaîtrait lors de nos études.

11761 Dans l'approche des traitements des maladies infectieuses, le développement de modèles de pharmacologie *in vivo* demeure indispensable. Les tests *in vitro* à dispositions, effectués préalablement pour valider l'intérêt de la cible, ne permettent pas d'appréhender les mécanismes d'action de l'infection et les interactions hôtes/pathogènes.

L'ambition du projet est de proposer une approche innovante de stimulation des défenses immunitaires de l'organisme lors des infections bactériennes (Proof Of Concept). Ce traitement pourra être administré seul ou en association avec une antibiothérapie plus ciblée. L'objectif scientifique et économique à terme est de diminuer l'antibiorésistance chez l'homme, par une maîtrise des doses et des temps de traitement aux antibiotiques.

Pour la réalisation des expériences, nous proposons un ensemble de modèles de pharmacologie *in vivo* : maladies infectieuses, inflammation et animaux transgéniques.

Les modèles utilisés et développés pour le projet sont des modèles souris.

Une attention toute particulière est portée sur le nombre d'animaux utilisés dans le projet. Nous travaillons avec une compagnie spécialisée dans les biostatistiques. Cette collaboration nous permet d'utiliser le nombre strictement nécessaire pour chaque expérience et de l'optimiser durant toute la durée du projet.

Le nombre calculé de souris nécessaire sera au maximum 4000.

Une veille scientifique est mise en œuvre pour étudier toute méthode scientifique alternative à l'expérimentation animale dans le domaine. Pour les protocoles où la douleur ne peut pas être prise en charge par des analgésiques, une observation accrue et des critères d'arrêt plus stricts seront mis en place.

11762 Etude translationnelle des interactions cerveau-foie dans les troubles de l'usage de l'alcool
(Durée du projet : 5 ans)

But du projet : la recherche appliquée et translationnelle

Dans ce projet, nous étudierons la dynamique des altérations cérébrales et hépatiques dans les Troubles de l'Usage de l'Alcool (TUAL). Les nombreux phénomènes neuro-adaptatifs développés lors de la consommation chronique d'alcool et de son sevrage pourraient avoir d'énormes répercussions sur l'apparition et l'évolution des troubles cérébraux et cognitifs observés chez les patients TUAL. Les effets d'une consommation chronique et excessive d'alcool sur le fonctionnement moteur et cognitif sont de nature et d'intensité variable suggérant un continuum dans la sévérité des atteintes, allant de patients TUAL ne présentant pas d'altérations cérébrales et

cognitives à d'autres présentant des atteintes modérées jusqu'aux patients atteints d'un syndrome de Korsakoff ayant des troubles cognitifs très sévères et irréversibles. Par ailleurs, les complications hépatiques sévères sont retrouvées lors de l'apparition d'une cirrhose alcoolique, celle-ci pouvant évoluer vers une encéphalopathie hépatique pouvant conduire à un coma ou au décès. Bien que ces liens entre le foie et le cerveau soient dans la littérature, leur ordre d'apparition et leur dynamique d'interaction ne sont pas encore connus. Ce projet vise à mieux comprendre les effets délétères, notamment sur le cerveau et le foie, de la consommation chronique d'alcool chez l'homme grâce à un modèle animal de rongeur. La recherche fondamentale permet, grâce aux modèles animaux, de s'affranchir des limites rencontrées dans la recherche clinique chez l'homme, notamment d'hétérogénéité interindividuelle (très forte dans cette pathologie), de suivi longitudinal et de contrôle des consommations. Afin de déterminer la chronologie d'apparition et la progression de ces atteintes, nous utiliserons donc un modèle animal du TUAL.

Le but de ce projet est d'évaluer les effets de l'alcool sur le comportement, le cerveau et le foie à différents temps d'exposition à l'alcool sur des souris qui ont précédemment consommé de l'alcool de façon chronique.

Les rongeurs sont des modèles souvent utilisés dans le domaine de la recherche sur l'alcool, car ils reproduisent diverses caractéristiques de la problématique chez l'homme, comme l'addiction, le risque de rechute post-sevrage, les processus neuro-adaptatifs lors de l'accoutumance ou du sevrage. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature rend cette espèce particulièrement intéressante pour étudier l'impact de la consommation d'alcool, d'autant qu'il existe de nombreuses souches transgéniques.

Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester nos hypothèses chez l'animal. Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous :

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet est choisi afin de s'assurer que nous utilisons le nombre minimal d'animaux pour atteindre le résultat souhaité. Ce projet, comporte 2 grandes procédures : la première nécessitera 165 souris et la deuxième 72 souris donc 237 souris au total.

Les animaux seront anesthésiés durant la chirurgie. La douleur suite à la chirurgie est considérée comme légère voire modérée : en effet, l'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire montre que les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun « sickness behaviour syndrome ». Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes suite à la chirurgie et sont ensuite euthanasiés en conformité avec la loi.

Mots clefs : alcool ; foie ; cerveau ; translationnel

11763 Les lymphomes T périphériques (les PTCL) désignent un ensemble de cancers des lymphocytes T, qui atteignent les ganglions des patients. Les lymphomes T périphériques sont assez fréquents et représentent 10% des lymphomes. La plupart de ces PTCL ont des formes agressives, associées à un mauvais pronostic. Le taux de survie des patients est environ de 30% à 5 ans. Il est donc urgent de développer de nouvelles thérapies ciblant ce lymphome.

Les PTCL sont associés à différentes mutations génétiques. Parmi elles, notre équipe a mis en évidence des mutations des protéines qui contrôlent la multiplication des cellules, fréquentes chez les patients atteints de PTCL. Ces anomalies pourraient se traduire par une prolifération non contrôlée des cellules participant au développement de la tumeur. Deux nouveaux traitements pourraient restaurer la prolifération normale des cellules. Ces traitements ont déjà montré des résultats prometteurs sur d'autres types de cancers (neuroblastome et sarcome) et constituent une piste de traitement intéressante pour les PTCL.

Nous disposons de différentes lignées cellulaires dérivées de lymphomes humains. Cependant, une simple étude sur ces lignées ne permet pas de refléter la complexité de l'environnement tumoral, ni de réaliser des études pré cliniques pour le traitement des PTCL avec les traitements proposés ci-dessus. C'est pourquoi nous devons recourir au modèle murin.

Le but de ce projet est donc d'établir des modèles murins de PTCL, pour tester ces traitements. Des souris immunodéprimées seront greffées avec différentes lignées cellulaires, représentatives de la diversité des PTCL. Sur ces modèles, nous étudierons l'efficacité des traitements, leur mode d'action sur les PTCL et les facteurs de réponse ou de résistance à ces traitements.

En se basant sur les données de la littérature, nous avons évalué la quantité de souris nécessaire et suffisante à la conduite de ce projet à 448 souris sur 5 ans. Ce nombre permettra de conclure avec certitude sur l'efficacité des traitements testés, en réduisant au minimum le nombre d'animaux engagés. Les procédures mises en œuvre (implantation de tumeurs en sous cutanée ou injection) sont largement documentées, et n'induisent qu'une gêne modérée pour l'animal. De même, des publications récentes ont montré que les traitements utilisés ne sont pas toxiques pour l'animal. Enfin, le personnel engagé dans ces expérimentations assurera une veille quotidienne des animaux sur la base des critères précis observables afin d'anticiper tout signe de douleur. Ces critères comprendront entre autres la fréquence de toilettage de l'animal, sa mobilité, son poids ou ses interactions sociales. Le personnel prendra les mesures nécessaires pour assurer le bien-être des souris. Par exemple, des capsules de gel nutritif seront ajoutées à la litière lorsque les tumeurs généreront les déplacements des animaux. Si un gène persiste, les souris seront retirées du protocole.

11764 L'allaitement artificiel est une pratique courante en élevage ovin et est utilisée pour sauver les agneaux surnuméraires, issus de mères non maternelles ou précocement tarées. Toutefois cette pratique est associée à des perturbations comportementales et hormonales du jeune agneau avec des conséquences à long terme. L'hypophyse étant la principale glande régulant la libération des hormones impliquées dans la reproduction, la croissance et la nutrition, nous avons étudié son développement par imagerie par résonance magnétique (IRM) et avons montré un retard de développement chez les agnelles allaitées artificiellement. Ce projet a pour objectifs de caractériser l'origine de cette altération de développement en mesurant des marqueurs cellulaires, biochimiques et génomiques, et de rechercher une corrélation entre ces marqueurs et les paramètres obtenus par IRM.

Une corrélation entre ces marqueurs et les paramètres obtenus par IRM.

L'étude que nous proposons nécessite un nombre total de 120 animaux de race Ile de France (30 brebis et 90 agneaux) et les procédures expérimentales ne devraient concerner que 36 agnelles de ces 120 animaux. En effet, compte tenu des statistiques de mortalité en élevage (10 à 20%), l'effectif maximal d'agnelles expérimentales est fixé à 48 agnelles et ne devrait pas dépasser 15% de l'effectif initial (n=36) soit 41 individus. Les agnelles expérimentales seront réparties en six lots expérimentaux en fonction de la modalité d'élevage (maternage ou allaitement artificiel) et de l'âge (1, 4 et 7 semaines) : "maternées 1 semaine", "maternées 4 semaines", "maternées 7 semaines", "allaitées artificiellement 1 semaine", "allaitées artificiellement 4 semaines" et "allaitées artificiellement 7 semaines". Pour assurer un environnement social enrichissant et stable tout au long de l'expérience, les animaux non expérimentaux constituent les partenaires sociaux répartis de manière égale dans les six différents lots expérimentaux.

En résumé, les 120 animaux sont répartis comme suit : pour les groupes "maternées" il y aura 30 brebis allaitantes et 60 agneaux dont les agnelles expérimentales des lots "maternées 1 semaine", "maternées 4 semaines" et "maternées

7 semaines" ; pour les groupes "allaitées artificiellement", il y aura 30 agneaux dont les agnelles expérimentales des lots "allaitées artificiellement 1 semaine", "allaitées artificiellement 4 semaines" et "allaitées artificiellement 7 semaines". A l'issue de cette étude, les animaux partenaires retourneront en élevage.

Cette étude respecte la règle des 3 R :

Réduction : nous avons choisi un effectif total de 36 agnelles qui est un nombre minimum pour rechercher l'existence de corrélation. Nous avons réuni toutes les conditions de raffinement pour notre protocole en respectant les groupes sociaux (taille et constitution).

Raffinement : Toutes les mesures seront prises pour favoriser le bien-être des animaux notamment en préservant leur besoin d'être en contact avec leurs congénères et en leur apportant nourriture et soins ajustés à leur condition physiologique. Lors des transports, afin de limiter les stress psychologiques, les animaux ne seront jamais séparés de leur partenaire et seront maintenus en groupe. Ces groupes sont constitués des animaux partenaires non expérimentaux (frère et/ou sœur et/ou la mère selon que les agneaux expérimentaux sont en allaitement artificiel ou maternel). Les manipulations inhérentes au protocole (pesée, prises de sang) seront réalisées dans le respect de l'animal après habituation. Lors de l'anesthésie, afin de limiter la douleur liée à l'intubation, la taille de la sonde trachéale sera adaptée à la taille de l'agneau et sera enduite d'une pommade anesthésiante (Xylocaïne visqueuse 2%). Pendant les acquisitions IRM, des bouchons d'oreilles et un coussin enrobant seront placés sur l'agneau pour limiter l'exposition au bruit. De plus, les animaux sont emmaillottés dans un linge en tissu pour éviter un contact direct avec la table d'acquisition et assurer un meilleur confort. Enfin, pour limiter le stress de la mise à mort, celle-ci sera réalisée sur l'animal toujours anesthésié par une injection létale de barbiturique avant saignée.

Remplacement : Cette étude s'intéressant à l'adaptation de l'animal à l'allaitement artificiel, il ne peut s'entreprendre que sur l'animal vivant et aucune méthode de remplacement comme une étude *in vitro* n'est envisageable.

Les données acquises dans cette étude sont cruciales pour comprendre l'impact de l'allaitement artificiel sur le développement hormonal des brebis. Ces travaux permettront de cibler les axes endocriniens (reproduction, croissance, nutrition) les plus sensibles à l'environnement précoce et de proposer des stratégies pour contrebalancer l'impact de l'allaitement artificiel. De façon plus générale, cette étude apporte des données originales sur le développement endocrinien des mammifères.

11765 Le mélanome oculaire, se développant à partir des mélanocytes de l'œil, est le cancer primitif intraoculaires le plus fréquent dans la population adulte. Une grande majorité des patients développe des métastases hépatiques. Actuellement, il n'existe pas de traitements pour le mélanome uvéal métastatique. Ceci est en partie dû à l'absence de modèles expérimentaux (cellulaires, animaux) de mélanome uvéal permettant la formation de métastases hépatiques.

Le but du projet est d'identifier des cibles thérapeutiques et de tester l'efficacité d'inhibiteurs de ces cibles à réduire les métastases hépatiques de mélanome uvéal. Le seul modèle existant pour générer des métastases de mélanome uvéal au foie réside dans l'injection de ces dernières dans la rate. Ainsi, nous souhaiterions construire un modèle cellulaire de mélanome uvéal qui métastase au foie après leur injection en intraveineuse et dont la mise en œuvre sera plus facile et moins douloureuse pour l'animal comparé à une injection dans la rate. Ce modèle pourrait s'avérer utile à l'ensemble de la communauté scientifique travaillant dans ce domaine. Une fois ce modèle établi, il serait possible d'étudier l'efficacité de certaines molécules dans le but de lutter contre la formation de métastases hépatiques.

Nous utiliserons des souris nude et des souris NSG (NOD scid gamma). Ces deux modèles sont connus pour être les plus immunodéficients existant actuellement. Grâce à leur utilisation, nous pourrions injecter des cellules humaines de mélanome uvéal en intraveineux par la veine caudale et dans la rate sans risque de rejet.

En terme de remplacement, des études *in vitro* seront réalisées dans un premier temps pour définir l'efficacité des molécules dans l'induction de la mort ou l'arrêt de la prolifération des cellules de mélanome uvéal. *In vitro*, nous définirons la concentration des molécules à utiliser ainsi que leurs effets.

En terme de réduction, le nombre d'animaux nécessaire à cette étude a été déterminé à l'aide d'un test de puissance statistique. Un nombre minimum d'animaux sera donc utilisé. Dans la procédure 1, nous créerons une lignée cellulaire avec un tropisme hépatique. Pour toutes les procédures, nous utiliserons des cellules fluorescentes (dTomato) et luminescentes (luciférase). Le nombre d'animaux sera réduit au maximum grâce à un suivi longitudinal précis et quantifiable par imagerie.

En terme de raffinement, les souris seront observées quotidiennement par les animaliers et de façon exhaustive deux fois par semaine par les demandeurs du projet afin de prendre en charge tout signe de douleur, stress ou inconfort. Les manipulateurs, habitués à l'expérimentation sur les souris, éviteront tout dommage à l'animal lors des injections. Des points limites précis sont définis dans chaque procédure. L'utilisation des cellules luminescentes nous permettra d'utiliser l'imagerie longitudinale précise et quantifiable afin de déterminer précisément la taille tumorale et de réduire la souffrance des animaux.

Un nombre total de 682 animaux sera utilisé.

11766 La transplantation d'hépatocytes est une alternative clinique à la transplantation d'organes pour les maladies métaboliques du foie. Cependant, cette approche est limitée par la pénurie croissante de donneur et à l'incapacité à amplifier les hépatocytes *in vitro*. De plus, ces limites sont aussi très contraignantes pour des études fondamentales *in vitro* avec des hépatocytes humains. Notre but est de développer des nouvelles technologies pour produire en masse des hépatocytes humains. La première stratégie consiste à utiliser le rat comme bio-incubateur pour amplifier les hépatocytes humains isolés d'une biopsie. Les hépatocytes humains seront greffés dans le foie de rats qui auront été préalablement traités de manière à accepter la xénogreffe et à les amplifier au détriment de leurs propres hépatocytes. Nous avons déjà pu démontrer qu'une repopulation du foie par des hépatocytes humains chez des rats immunodéficients (RRG : rats Rag et Il2Rg KO) étaient possibles mais avec un faible taux de repopulation mais cela permet quand même d'avoir des taux d'albumine humaine importante. La seconde stratégie consiste à produire des hépatocytes à partir de cellules souches pluripotentes (CSP) humaines. Les CSP peuvent être générées à partir des cellules somatiques d'un individu dans lesquelles ont été surexprimées des facteurs de pluripotence ou issues de cellules embryonnaires (CSE). Les CSP peuvent être amplifiées *in vitro* puis différenciées en hépatocytes. Cependant, ces hépatocytes dérivés de cellules souches pluripotentes (CSP-Hep) ont un phénotype d'hépatocytes fœtaux (immatures). L'objectif de ce projet est d'utiliser le rat immunodéficient RRGs (rat KO pour Rag 1 et IL2Rg et Tg pour le Sirpa humain) comme un bioréacteur pour la production d'hépatocytes humains. Cette nouvelle génération de rats immunodéficient permet d'inactiver l'interaction entre les macrophages de rat et les cellules humaines. Ce qui permettra une meilleure efficacité de repopulation du foie par les hépatocytes humains. Lorsque les données préliminaires concernant les meilleurs souches d'hépatocytes pour le repeuplement du foie seront disponibles, nous les utilisons pour limiter le nombre d'animaux impliqués. Nous prendrons en compte tous les éléments nécessaires afin de limiter au maximum la douleur de l'animal. Le nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet est de 300 animaux

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivit comme suit :

- Remplacer : Des études fonctionnelles *in vitro* ont été réalisées au préalable. Mais du fait de l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire, ces études ne peuvent remplacer les études *in vivo*. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité de ces cellules dans des modèles *in vivo* proche de l'homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique pourra être le modèle de rats dits "humanisés"

- Réduire : le nombre d'animaux a été réduit à 300 rats, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

-Raffiner : Un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos vouté, agressivité.) sera réalisé. Les animaux montrant des signes caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement ou de souffrance pourront être euthanasiés. De plus, afin de réduire l'angoisse, un produit d'enrichissement (igloo en PVC) sera utilisé et placée dans des cages en portoirs ventilées. Lors de la procédure chirurgicale et du réveil de l'animal, des tapis chauffants seront utilisés.

Nous utiliserons des tests statistiques afin de mesurer les productions de facteurs sériques humains, ASAT et ALAT. Nous utiliserons dans ce cas-là, les mesures effectuées à J0 afin d'avoir des mesures de références. Pour cela, des comparaisons de groupes seront faites avec des tests

statistiques non paramétriques pour échantillons non appariés tels que le test de Mann-Whitney pour comparer 2 groupes ou de Kruskal Wallis pour comparer plus de 2 groupes.

11767 L'allaitement artificiel est une pratique courante en élevage ovin et est utilisée pour sauver les agneaux surnuméraires, issus de mères non maternelles ou précocement tarées. Toutefois cette pratique est associée à des perturbations comportementales et hormonales du jeune agneau avec des conséquences à long terme. L'hypophyse étant la principale glande régulant la libération des hormones impliquées dans la reproduction, la croissance et la nutrition, nous avons étudié son développement par imagerie par résonance magnétique (IRM) et avons montré un retard de développement chez les agnelles allaitées artificiellement. Ce projet a pour objectifs de caractériser l'origine de cette altération de développement en mesurant des marqueurs cellulaires, biochimiques et génomiques, et de rechercher une corrélation entre ces marqueurs et les paramètres obtenus par IRM.

L'étude que nous proposons nécessite un nombre total de 120 animaux de race Ile de France (30 brebis et 90 agneaux) et les procédures expérimentales ne devraient concerner que 36 agnelles de ces 120 animaux. En effet, compte tenu des statistiques de mortalité en élevage (10 à 20%), l'effectif maximal d'agnelles expérimentales est fixé à 48 agnelles et ne devrait pas dépasser 15% de l'effectif initial (n=36) soit 41 individus. Les agnelles expérimentales seront réparties en six lots expérimentaux en fonction de la modalité d'élevage (maternage ou allaitement artificiel) et de l'âge (1, 4 et 7 semaines) : "maternées 1 semaine", "maternées 4 semaines", "maternées 7 semaines", "allaitées artificiellement 1 semaine", "allaitées artificiellement 4 semaines" et "allaitées artificiellement 7 semaines". Pour assurer un environnement social enrichissant et stable tout au long de l'expérience, les animaux non expérimentaux constituent les partenaires sociaux répartis de manière égale dans les six différents lots expérimentaux.

En résumé, les 120 animaux sont répartis comme suit : pour les groupes "maternées" il y aura 30 brebis allaitantes et 60 agneaux dont les agnelles expérimentales des lots "maternées 1 semaine", "maternées 4 semaines" et "maternées 7 semaines" ; pour les groupes "allaitées artificiellement", il y aura 30 agneaux dont les agnelles expérimentales des lots "allaitées artificiellement 1 semaine", "allaitées artificiellement 4 semaines" et "allaitées artificiellement 7 semaines". A l'issue de cette étude, les animaux partenaires retourneront en élevage.

Cette étude respecte la règle des 3 R :

Réduction : nous avons choisi un effectif total de 36 agnelles qui est un nombre minimum pour rechercher l'existence de corrélation. Nous avons réuni toutes les conditions de raffinement pour notre protocole en respectant les groupes sociaux (taille et constitution).

Raffinement : Toutes les mesures seront prises pour favoriser le bien-être des animaux notamment en préservant leur besoin d'être en contact avec leurs congénères et en leur apportant nourriture et soins ajustés à leur condition physiologique. Lors des transports, les animaux ne seront jamais séparés de leur partenaire et seront maintenus en groupe. Ces groupes sont constitués d'animaux non expérimentaux (frère et/ou sœur et/ou la mère selon que les agneaux expérimentaux sont en allaitement artificiel ou maternel). Les manipulations inhérentes au protocole (pesée, prises de sang) seront réalisées dans le respect de l'animal après habituation.

Remplacement : Cette étude s'intéressant à l'adaptation de l'animal à l'allaitement artificiel, il ne peut s'entreprendre que sur l'animal vivant et aucune méthode de remplacement comme une étude *in vitro* n'est envisageable.

Les données acquises dans cette étude sont cruciales pour comprendre l'impact de l'allaitement artificiel sur le développement hormonal des brebis. Ces travaux permettront de cibler les axes endocriniens (reproduction, croissance, nutrition) les plus sensibles à l'environnement précoce et de proposer des stratégies pour contrebalancer l'impact de l'allaitement artificiel. De façon plus générale, cette étude apporte des données originales sur le développement endocrinien des mammifères.

11768 Le cancer du sein représente la première cause de mortalité des femmes par cancer dans le monde. La forte mortalité associée à ce cancer dépend du développement des métastases, pour lesquelles il n'existe à ce jour aucun marqueur ni traitement spécifique. Les phénomènes qui conduisent à la formation des métastases sont complexes et font intervenir de multiples paramètres tels que l'invasion de la matrice extracellulaire, la survie et la distribution dans la circulation lymphatique/sanguine, la furtivité vis-à-vis du système immunitaire et la colonisation d'organes à distance de la tumeur primaire. Il est primordial de déterminer les mécanismes impliqués dans la progression métastatique afin d'individualiser des facteurs pronostics, ainsi que des cibles thérapeutiques. Ces phénomènes complexes ne peuvent pas s'étudier exclusivement *in vitro* et nécessitent l'utilisation de modèles animaux.

Le récepteur purinergique P2X7 stimule l'invasion cancéreuse *in vitro* et nous émettons l'hypothèse qu'il participe à la croissance tumorale et à la formation des métastases *in vivo*. Il est surexprimé dans de nombreux cancers et notamment dans le cancer du sein. Nous avons montré *in vitro* que P2X7 était fortement exprimé et parfaitement fonctionnel dans des cellules cancéreuses mammaires de haut potentiel métastatique, et non dans les cellules épithéliales mammaires non cancéreuses. Nous avons également montré que des antagonistes pharmacologiques de P2X7 réduisent l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires *in vitro*. Par conséquent des études impliquant des modèles de développement tumoral et de formation de métastases chez la souris sont requises afin de déterminer le rôle de l'expression du récepteur P2X7 par les cellules cancéreuses mammaires. Par ailleurs, ce récepteur étant exprimé par les cellules immunitaires, il pourrait être impliqué dans la réponse anti-tumorale. C'est pourquoi l'implication de P2X7 (exprimé à la fois dans les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires de l'hôte), dans le développement tumoral nécessite d'être étudiée plus précisément. Le récepteur P2X7 est physiologiquement co-exprimé avec le récepteur P2X4, qui, parmi l'ensemble des récepteurs P2X présente le plus fort niveau d'homologie avec P2X7. Il est également important de déterminer si le récepteur P2X4 possède lui aussi un effet pro-tumoral.

Ce projet a pour objectif de comprendre le rôle de P2X7 dans le développement des métastases *in vivo* et d'évaluer son potentiel en tant que cible thérapeutique.

Nous utiliserons un modèle de xéno greffes de cellules cancéreuses mammaires murines 4T1, modifiées pour l'expression ou non de P2X7, chez la souris BALB/c afin de suivre la croissance tumorale et le développement métastatique. Ce modèle sera développé chez des souris BALB/c sauvages (P2X7+/+) ou invalidées pour l'expression de P2X7 (P2X7-/-).

Nous aurons par conséquent les procédures suivantes :

1) Greffes mammaires de cellules 4T1 à des souris P2X7

Ces expériences nous permettront de déterminer la participation des récepteurs P2X7, qu'ils soient exprimés par les cellules cancéreuses ou par les cellules de l'hôte et en particulier par les cellules immunitaires, dans la croissance et la progression tumorale.

Nous émettons l'hypothèse que la perte d'expression de P2X7 dans les cellules cancéreuses va réduire la croissance tumorale et le développement de métastases chez la souris KO P2X7, avec peut-être un effet moindre chez la souris sauvage.

Nous essaierons de déterminer le potentiel anti-tumoral que peut présenter l'utilisation d'agents pharmacologiques antagonistes (2 différents) du récepteur P2X7.

Pour cela nous utiliserons les procédures suivantes :

2) Greffe mammaire de cellules 4T1 à des souris P2X7 + injections de solvant, d'antagoniste 1, ou d'antagoniste 2.

Nous formulons l'hypothèse que les antagonistes pharmacologiques vont réduire la croissance tumorale et le développement de métastases.

Enfin, nous proposons également de comparer ces effets à ceux obtenus lors de l'invalidation de l'expression du gène P2RX4 codant pour le récepteur P2X4, dans les cellules cancéreuses mammaires 4T1 sur la croissance tumorale, chez la souris BALB/c sauvage.

Pour cela nous réaliserons la procédure suivante :

3) Greffe mammaire de cellules 4T1 P2X4

Ce projet nécessitera 168 animaux et sera réalisé conformément à la règle des 3R : le suivi de la croissance tumorale sera évalué par imagerie de bioluminescence, approche non invasive, *in vivo* et par mesure au pied à coulisse (indolore). Par ailleurs, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

11769 Les chondrosarcomes sont des tumeurs osseuses malignes qui arrivent en deuxième position des tumeurs osseuses primitives après les ostéosarcomes. Actuellement, aucun traitement adjuvant, permettant d'augmenter l'efficacité des traitements ou de la chirurgie, n'a fait la preuve de son efficacité et le traitement des chondrosarcomes se limite essentiellement à l'exérèse chirurgicale large de la tumeur avec des risques de récurrence. Le taux de survie à 10 ans des patients atteints de chondrosarcomes n'a pas montré d'amélioration significative au cours des dernières décennies. Ainsi, il y a un important besoin de développer de nouvelles thérapies ciblées à fort impact sur le chondrosarcome.

Plusieurs études ont montré que l'activation permanente de certaines voies de signalisation cellulaire dans le chondrosarcome joue un rôle de premier plan dans la promotion de la croissance tumorale et la prévention de la mort cellulaire. Nos résultats récents ont permis de montrer la présence d'une activation anormale du récepteur EGFR, un récepteur au facteur de croissance EGF, qui contrôle en aval les voies PI3K/AKT et MEK/ERK dans le chondrosarcome, ces voies étant impliquées dans l'acquisition du caractère cancéreux des cellules. Ainsi, les stratégies thérapeutiques ciblant l'EGFR conduit à l'inactivation de ces 2 voies et par conséquent à l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses et à l'augmentation de la mort cellulaire.

L'objectif principal de ce projet est d'évaluer l'effet anti-tumoral de l'inhibition ciblée du récepteur EGFR par un inhibiteur spécifique de ce récepteur, l'AG1478, dans un modèle de greffe de tumeurs humaines chez la souris nude. Ce modèle est couramment utilisé en cancérologie dans les études précliniques : il permet l'implantation et la croissance de cellules tumorales d'origine humaine dans le flanc de la souris immunodéficiente et par conséquent l'observation de l'évolution des tumeurs *in vivo* avant et après traitement par les inhibiteurs. Cette étape est cruciale pour l'évaluation préclinique de l'efficacité de l'inhibition du récepteur EGFR sur la progression des tumeurs *in vivo*.

Pour cette étude, 2 groupes d'animaux (n=8) seront constitués, soit 16 animaux au total :

1) Tumeur induite avec le chondrosarcome HEMC-SS qui va servir de témoin et traitée avec l'excipient (15% Captisol),

2) Tumeur induite avec le chondrosarcome HEMC-SS et traitée avec l'AG1478 (inhibiteur du récepteur à l'EGF) à la dose de 50mg/kg/jour dans 15% Captisol.

La taille des tumeurs sera mesurée deux fois par semaine.

Les données de la littérature ne mentionnent pas d'effets indésirables de l'excipient à ces doses, ni d'effets autres que sur la tumeur pour la molécule testée. Même si des études peuvent être menées sur des modèles cellulaires (Remplacement), le modèle animal est indispensable pour connaître l'effet de cette molécule sur la prolifération des tumeurs. Dans un souci d'éthique le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum et est nécessaire et suffisant pour les études statistiques (Réduction). Enfin, les cellules cancéreuses seront injectées sous cutanée dans le flanc de la souris sous anesthésie générale afin de limiter la souffrance des animaux. De plus le milieu des souris, stabulées par groupes de 4, sera enrichi avec de l'essuie-tout et les souris seront observées quotidiennement afin de s'assurer de leur bien-être et elles seront mises à mort si le volume de la tumeur devient trop important (Raffinement). Mise en place de points limites afin de limiter la douleur éventuelle. Après 3 semaines de traitement, les souris seront mises à mort pour évaluer par histologie l'efficacité du traitement.

11770 Les produits biologiques d'origine animale (PBOA) sont des produits utilisés par la communauté scientifique comme outils de diagnostics ou réactifs pour tests biologiques à partir du sang de lapin, non substituables par des méthodes *in vitro* ou composés chimiques.

Ce projet a pour but de mettre à la disposition de la communauté scientifique ou de l'industrie des produits en provenance du lapin (sang, plasma, sérum), hébergé dans un environnement enrichi.

Ces animaux sont prélevés en fonction des besoins des scientifiques dans le respect des recommandations éthiques, notamment en termes de volume et de temps de récupération.

Le respect de ces recommandations nous permet de préserver notre lot d'animaux en bon état général et de limiter le nombre d'animaux utilisés pour ce projet.

Lorsque cela est nécessaire les prélèvements sont réalisés après une anesthésie générale de l'animal.

Les prélèvements sont prioritairement réalisés sur des animaux de surplus.

Le nombre d'animaux utilisés est estimé à 1600 lapins par an, soit un total de 8000 lapins sur la durée du projet. Ce nombre d'animaux est directement lié aux demandes des scientifiques.

11771 La neurotensine (NTS) est une hormone du tractus gastro-intestinal, qui participe à la digestion des aliments. La neurotensine a de nombreuses actions qui sont d'origine centrale ou périphérique, comme la régulation de la prise alimentaire, de l'activité locomotrice, de la température, de la pression artérielle, de la gestion du stress, et l'absorption des acides gras, etc. Son action est transmise à la cellule par des récepteurs, le plus important étant le récepteur de haute affinité, le NTSR1.

Notre projet de recherche s'est focalisé depuis de nombreuses années sur le rôle du couple NTS-NTSR1 dans le cancer. Ainsi nous avons pu démontrer que la neurotensine était un facteur lié à l'agressivité tumorale, par ses actions sur la croissance tumorale et sur les processus métastatiques. Dans les tumeurs, ses effets sont principalement transmis par l'activation du récepteur de la neurotensine de haute affinité, le NTSR1. Ce récepteur est surexprimé dans les cancers solides. Nous avons montré que l'expression élevée de NTSR1 est un marqueur de mauvais pronostic pour les cancers du poumon, du sein, et pour de nombreux autres cancers. L'expression de ce couple est également associée à la résistance aux traitements anticancéreux. Nous avons donc cherché à développer des stratégies thérapeutiques qui vont inhiber ce couple NTS-NTSR1 afin de diminuer l'agressivité des tumeurs et de restaurer la réponse aux traitements.

La NTS est synthétisée à partir d'un précurseur qui est clivé pour produire le peptide. Un défaut de clivage produit une forme longue de la NTS, le LF-NTS. Cette forme présente la même activité biologique que le peptide mature, mais est beaucoup plus stable. Les taux circulants élevés de LF-NTS sont corrélés au développement du cancer du sein, et à la mortalité globale. La NTS et le NTSR1 sont exprimés de manière concomitante dans 30 à 60 % des cancers. Dans le but d'inhiber les effets de la NTS, nous avons développé un anticorps neutralisant dirigé contre la forme LF-NTS. Notre stratégie est de diminuer l'activité du NTSR1 et ainsi réduire l'agressivité tumorale.

Les données précliniques démontrent qu'effectivement l'anticorps murin dirigé contre LF-NTS diminue la croissance de la tumeur, réduit les processus métastatiques, et améliore la réponse aux sels de platine. Afin d'établir l'innocuité de cet anticorps, nous avons pratiqué des traitements à long terme à des doses thérapeutiques efficaces pour le traitement des tumeurs et de leurs métastases. Ces traitements n'ont montré aucun effet toxique du traitement, mais plutôt des effets bénéfiques. Ainsi, ils nous ont permis de mettre en évidence une action de cet anticorps sur la prise de poids et l'activité des animaux suggérant que cet anticorps pourrait contrecarrer la cachexie induite par le cancer et globalement améliorer la qualité de vie des patients. L'objectif est d'ajouter cet anticorps aux traitements à base de sels de platine, lorsque les patients présentant un cancer métastatique du poumon sont en rechute après les thérapies ciblées ou les immunothérapies, ce qui correspond à 70 % des patients. Toutes ces données ont été obtenues par des données précliniques en utilisant un anticorps murin, afin de pouvoir utiliser cette thérapie en clinique humaine, il faut développer, caractériser, et valider les formes humaines et humanisées de cet anticorps. Ceci correspond à l'évolution de notre projet et de cette demande.

L'ensemble des résultats obtenus seront inclus dans la demande d'autorisation pour pratiquer une phase 1 chez l'homme.

Type d'animaux : Modèle murin commercial immunodéficient.

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 2550 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble.

Remplacement : Le criblage *in vitro* va nous permettre de remplacer l'utilisation d'animaux en utilisant les techniques de culture cellulaire. L'objectif étant de sélectionner les meilleurs anticorps candidats. Ces clones sélectionnés seront utilisés pour la partie *in vivo* qui fait l'objet de la présente demande.

Néanmoins, un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu qui est au cœur de ce projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier.

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

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

11772 L'établissement utilisateur final travaille dans le domaine de la fabrication de tests de diagnostics pour maladies infectieuses humaines (par exemple HIV, hépatites, toxoplasmose...). Ces tests de diagnostics sont produits à partir d'anticorps monoclonaux, qui sont obtenus par production de liquide d'ascites chez la souris.

Nous réalisons pour l'établissement utilisateur final uniquement la préparation des souris utilisées dans ce cadre : création d'une réaction auto-immune et diminution des défenses immunitaires par injection de pristane avec une analgésie à la buprénorphine.

Une période d'acclimatation de sept jours est respectée avant le démarrage de la procédure et une période de repos de treize jours est suivie avant l'irradiation et le transport. Les animaux sont ensuite envoyés à l'établissement utilisateur final pour la suite des procédures.

De plus en plus de productions d'anticorps monoclonaux pour production de tests de diagnostic sont réalisées *in vitro*. Cependant, certaines de ces productions ne sont aujourd'hui pas encore réalisables *in vitro*, ce qui est le cas pour certaines des productions de l'établissement utilisateur final. L'ensemble des nouveaux protocoles de production d'anticorps monoclonaux de cet établissement utilisateur final sont développés par des méthodes *in vitro*.

L'utilisation d'animaux pour la production de certains anticorps monoclonaux a été justifiée par l'établissement utilisateur final de manière écrite, lors de sa demande d'autorisation de projet. Cette justification nous a été transmise.

Le nombre de souris prévu pour ce protocole est d'environ 10 200 par an correspondant à 17 lots de 600 souris, soit 51 000 souris sur 5 ans. Un suivi quotidien des animaux sera effectué avec la mise en place de points limites spécifiques.

11773 Les antibiotiques ont révolutionné la prise en charge des infections bactériennes. Toutefois, l'augmentation de leur consommation a été de concert avec l'expansion des résistances bactériennes et présage à des impasses thérapeutiques imminentes. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) s'alertait en Octobre 2016 de la grave menace de « l'ère post-antibiotique », et la nécessité absolue de trouver des alternatives thérapeutiques.

On note par exemple que la proportion d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (antibiotiques de derniers recours) est devenue préoccupante en Europe. Certes le taux de résistance des entéobactéries est assez faible en France (jusqu'à 0,7% en 2015) mais est plus forte en Europe de l'Est (10%) et notamment en Grèce (jusqu'à 60% de résistance). Cette augmentation de résistance est majoritairement attribuable à la production de carbapénémase de type OXA-48.

Le microbiote intestinal est un important réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques. Cependant, son implication dans l'acquisition et la persistance de résistances n'est pas clairement élucidé. La colonisation intestinale par un organisme multirésistant aux médicaments (ORDM) peut évoluer d'un portage asymptomatique à diverses infections, principalement urinaires, digestives et sanguines. De plus, le transport digestif du MDRO peut entraîner une contamination de l'environnement et sa transmission à des sujets sains ou malades. Par conséquent, il est d'une importance majeure de diminuer et même de supprimer le transport digestif du MDRO pour limiter la propagation de la résistance aux antimicrobiens. Dans un modèle murin de portage digestif d'Enterococcus résistant à la Vancomycine (ERV), une équipe a rapporté qu'il était possible d'éradiquer le portage d'ERV par une transplantation fécale. Des stratégies de modulations du microbiote intestinal sont en cours d'évaluation par transplantation fécale mais son efficacité reste toujours très controversée et sa spécificité d'action ainsi que ses effets indésirables interrogés.

L'administration d'un probiotique (*Bacillus subtilis*) pourrait permettre une éradication d'un pathogène multirésistant sans utilisation d'antibiotique. En effet le genre *Bacillus* comprend différentes espèces de bactéries qui sont communément ingérées avec les légumes. Le bacille produit des composés qui confèrent une activité antimicrobienne contre divers pathogènes humains. Il a été démontré que le traitement oral avec *Bacillus subtilis* prévient diverses infections digestives chez le poulet, le lapin, le poisson et la souris, y compris les infections dues à *Escherichia coli*. Il a également permis une éradication d'une colonisation digestive asymptomatique de *Staphylococcus aureus* chez la souris. Cependant, on ne connaît toujours pas sa capacité à diminuer la colonisation intestinale asymptomatique d'*Escherichia coli* multirésistant.

Notre objectif de travail est de tester l'efficacité de l'éradication d'entérobactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 au sein du tractus digestif dans un modèle murin par l'administration de souches de *Bacillus subtilis* par voie orale. Pour cela nous utiliserons 288 souris SWISS mâles de 6 semaines de vie. Cette étude sera menée en appliquant la règle des 3R : Réduire au maximum le nombre de souris : le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable, effectivement pour les comparaisons intergroupes lors des études de portage de bactéries multirésistantes un minimum de douze animaux par groupe est nécessaire sur le plan statistique afin de valider les résultats. Nous avons donc choisi d'utiliser ce minimum d'animaux par groupe, à savoir 12. Raffiner en mettant en place des points limites : en cas d'infection et de souffrance les souris seront euthanasiées selon une procédure appropriée (dislocation cervicale sous anesthésie). Afin de réduire au maximum l'inconfort voire la douleur que les procédures de gavage gastrique et de lavement rectocolique peuvent engendrer, celles-ci seront faites sous anesthésie générale de courte durée par isoflurane. Au décours de ces manipulations les souris seront surveillées pendant une heure afin de s'assurer de l'absence de complications. Les autres manipulations ne sont pas censées entraîner de souffrance à l'animal (émission naturelle de selles, administration d'antibiotique dans l'eau de boisson). Remplacer au maximum l'utilisation des animaux : le modèle du microbiote digestif est si riche et complexe que les expérimentations in-vitro ne sont pas envisageables pour répondre aux questions scientifiques posées. Enfin le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude.

11774 La lamproie de Planer est une des trois espèces de lamproies européennes, toutes protégées au titre de la directive habitat faune-flore. Elle vit dans de petits cours d'eau, où elle se déplace pour

gagner ses sites de reproduction. Ces petits cours d'eau sont parfois fragmentés par des seuils (prise d'eau pour microcentrales électriques ou moulins) qui ne perturbent pas forcément la migration d'espèces emblématiques comme le saumon, et ne sont donc qu'exceptionnellement aménagés pour le franchissement par les poissons. Mesurer l'impact de ces obstacles sur les déplacements des lamproies de Planer constitue un fort enjeu de conservation. Ceci peut être fait grâce à un protocole de capture-marquage-recapture, où des individus capturés en aval de l'obstacle sont marqués (typiquement avec un transpondeur), puis la proportion d'individus recapturés à l'amont de l'obstacle indique sa franchissabilité. Cependant, ce type d'étude n'est représentatif que si la pose de transpondeur n'affecte pas la mobilité des poissons. Le projet soumis ici a pour objectif de tester l'effet de l'implantation d'un transpondeur cylindrique (même type de puces que pour marquer les chats domestiques) de 12 mm de long et 1 mm de diamètre dans la cavité générale sur la mobilité de lamproies de Planer adultes (10 à 15 cm de long, 15 mm de diamètre). Pour ce faire, 110 lamproies de Planer adultes seront prélevées par pêche à l'électricité dans le milieu naturel (têtes de bassin versant), et 90 d'entre elles (choisies parmi les 110 de sorte à homogénéiser les tailles corporelles ; les 20 autres seront relâchées) seront réparties en trois lots de 30 individus, et maintenues pendant un mois dans une section de 10 m de long d'un aquarium annulaire de 40 m de long dans lequel un courant d'eau sera généré, et où leurs déplacements seront notés (proportion d'individus en mouvement ou enfouis dans le substrat, proportion d'individus atteignant la limite amont et la limite aval de l'aquarium). Pour distinguer les individus marqués avec un transpondeur des individus non marqués, les individus des deux lots seront marqués avec une pâte élastomère de couleur différente selon le lot, injectée devant la nageoire dorsale. Ce marquage est classiquement utilisé sur les poissons, mais il pourrait éventuellement impacter la mobilité des individus. Un troisième lot, témoin, d'individus non marqués (ni avec un transpondeur ni avec l'élastomère) sera donc constitué pour tester l'effet du marquage avec l'élastomère. Le plan expérimental prévu est donc 30 individus non marqués, 30 individus avec élastomère et 30 individus avec élastomère et transpondeur, afin de tester l'effet de chaque type de marquage sur la mobilité. Les deux marquages se feront sous anesthésie par balnéation, en utilisant des instruments stériles. Le remplacement par un modèle de simulation ou par une autre espèce n'est pas envisageable ici, car l'objectif est précisément de tester l'effet du marquage sur la mobilité de cette espèce en particulier. L'effectif de 30 individus par lot est nécessaire pour atteindre une puissance statistique suffisante. Enfin, les conditions d'hébergement des lamproies seront adaptées de manière à ressembler au maximum à leurs conditions de vie naturelles : une surface de 10 m² pour 90 individus (= trois lots de 30 individus), ce qui correspond à la densité à laquelle cette espèce grégaire est observée dans la nature ; un substrat graveleux comme sur les sites de reproduction ; un constant flux d'eau de rivière (aquarium alimenté en circuit ouvert par de l'eau de rivière), une photopériode naturelle. Les adultes de cette espèce ne s'alimentent pas. L'observation quotidienne du comportement permettra de réagir rapidement à des signes d'inconfort exprimés par les animaux. En fin d'expérience, les individus seront relâchés en milieu naturel sur un site de reproduction proche de leur lieu de capture.

11775 Le cancer du côlon fait partie des quatre cancers les plus fréquents avec le cancer de la prostate, du poumon et du sein. Il représente la deuxième cause de mortalité chez l'homme et la troisième chez la femme. Actuellement, des traitements ciblant les globules blancs, cellules qui ont un rôle clé dans l'élimination de la tumeur, permettent d'obtenir des rémissions impressionnantes chez des patients. Cependant, seulement certains types de cancers colorectaux répondent à ces immunothérapies. Afin d'améliorer la réponse à ces traitements, une des stratégies consiste à mettre en place des combinaisons thérapeutiques. Chez l'humain, l'exercice physique est associé à un risque diminué de cancers, notamment digestifs. D'autre part, il a été montré chez la souris que l'exercice physique volontaire (dans une roue) pouvait favoriser la présence de certains globules blancs à l'intérieur de la tumeur en lien avec la libération par le muscle d'une molécule en réponse à ce type d'exercice. L'objectif de ce projet est donc d'étudier si l'application d'un protocole d'exercice physique établi sur tapis roulant peut améliorer la réponse à l'immunothérapie des souris porteuses de tumeurs colorectales. Nous investiguerons aussi si des molécules émises par l'os et le muscle, deux tissus réceptifs à l'exercice, sont impliqués dans la réponse des globules blancs à

l'immunothérapie. Ces résultats pourraient permettre de développer de telles combinaisons thérapeutiques chez les patients atteints de cancer colorectal.

Nous travaillerons avec deux modèles tumoraux murins, MC38 et CT26, le premier répondant mieux à l'immunothérapie. Les MC38 et les CT26 sont deux lignées cellulaires d'adénocarcinome colique couramment utilisées dans la recherche en immuno-oncologie. Nous réaliserons des analyses sur les globules blancs infiltrant les tumeurs de souris sédentaires ou soumises à deux régimes d'exercice différents effectués sur tapis roulant. Nous étudierons l'expression de marqueurs d'activation sur leur surface et leur répartition en différentes catégories de globules blancs. Ces recherches nous permettront de définir quel type d'exercice sera le plus efficace en combinaison avec une immunothérapie ciblant particulièrement une protéine, PD-1, exprimée par des globules blancs dysfonctionnels. Le nombre total de souris prévues pour la mise en œuvre de ce projet est de 250.

Notre étude, étant une investigation physiologique et impliquant la communication entre différents tissus de l'organisme (tumeur, muscles, os), nous ne pouvons remplacer ce modèle animal par aucune méthode alternative actuelle. Les deux modèles tumoraux utilisés ont été caractérisés préalablement, ce qui permet de s'affranchir de tests supplémentaires pour définir les temps auxquels les traitements doivent être administrés. Aussi, les protocoles d'exercice choisis ont déjà été décrits dans la littérature pour leur impact sur le muscle, ce qui permet de limiter les essais additionnels. Le raffinement du protocole prendra en compte le suivi de la taille des tumeurs à l'aide d'un pied à coulisse afin de s'assurer qu'elles restent inférieures à la taille classiquement utilisée comme point limite en cancérologie. Ce suivi individuel permettra la surveillance du bien-être des animaux qui seront hébergés par groupe de cinq à dix dans un établissement agréé.

11776 L'hypoxie néonatale est provoquée par un manque d'oxygène dans le cerveau du nouveau-né avant, pendant ou après l'accouchement. Cette condition crée des dommages au cerveau et peut parfois entraîner la mort du nouveau-né. Si le nouveau-né est traité juste après la naissance et que ce manque d'oxygène est rapidement pallié, un rétablissement complet peut être observé. Malheureusement, les dommages causés par l'hypoxie sont souvent irréversibles et entraînent des complications telles que handicap, retard mental, ou d'autres pathologies cérébrales.

Le but de ce projet scientifique est de déterminer le rôle neuroprotecteur du lactate et du resvératrol sur le cerveau souffrant d'hypoxie.

Notre objectif est d'établir les doses pharmacologiques des molécules montrant une neuroprotection ainsi que leur fenêtre d'action, pour envisager un transfert vers la clinique, et d'éclaircir les voies mises en jeu lors de cette neuroprotection.

Cette étude est menée sur un modèle d'hypoxie-ischémie néonatale chez le rat, largement décrit dans la littérature, entraînant une lésion cantonnée à un hémisphère cérébral. Notre projet nécessitant le fonctionnement du cerveau dans son intégrité afin de tester l'effet neuroprotecteur des molécules et de pouvoir envisager une application clinique rapide, le modèle d'hypoxie-ischémie du nouveau-né ne peut être reproduit que chez l'animal. Les résultats obtenus au cours de l'étude seront analysés en appliquant les statistiques appropriées (T-test), de façon à réduire le nombre d'animaux utilisés afin de rechercher des améliorations significatives des différents traitements (lactate et resvératrol).

L'évaluation de la neuroprotection grâce à l'imagerie par résonance magnétique permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires à ce projet. De même, les mâles et femelles de chaque portée sont inclus dans les études. Ainsi, un nombre maximal de 450 animaux sera utilisé pour ce projet (logigramme en PJ).

L'IRM permet un suivi non-invasif de la lésion. Une surveillance régulière des animaux est mise en place tout au long de la procédure afin de pouvoir réagir rapidement lorsque l'animal présente un état non-satisfaisant comme une perte de poids supérieure à 15%, des difficultés à s'alimenter ou encore des troubles de la motricité. La douleur pourra ainsi être rapidement soulagée par administration d'antalgique ou par mise à mort de l'animal. Les animaux seront hébergés en cage

collective (mère + petits), enrichie avec un nid végétal, du coton et un tunnel en carton afin de satisfaire au mieux à leur bien-être.

11777 Des observations épidémiologiques chez l'homme et les résultats de nombreuses études chez l'animal, ont démontré que la dénutrition ou l'obésité parentale (soit du père, de la mère ou des deux), prédisposent le nouveau-né à développer une obésité, des maladies cardiovasculaires et du diabète à l'âge adulte. Les enfants nés de parents malnutris présentent également des déficits d'apprentissage et une majeure susceptibilité de développer des maladies psychiatriques de type anxiété, dépression et schizophrénie. De façon similaire, les individus exposés pendant la gestation ou l'enfance à un stress psychologique ou psychosocial important, développeront plus facilement une obésité, des maladies cardiovasculaires et métaboliques ainsi que des désordres cognitifs du même ordre que ceux développés par les enfants de parents malnutris.

La susceptibilité pathologique induite chez la descendance par la malnutrition ou le stress parentale, est connue sous le nom de programmation métabolique ou d'Origine Développementale de la Santé et des Maladies (DOHaD, pour se sigles en anglais). Il s'agit d'un phénomène transgénérationnelle sous-tendu par des modifications épigénétiques de telle sorte que les petits enfants (génération F2), gardent une empreinte de la malnutrition ou du stress subis par leur grand parents (génération F0) même s'ils n'ont pas été exposés à aucun stress nutritionnel ou psychologique pendant leur développement. Cependant, on ignore quels sont les mécanismes moléculaires ou les systèmes de neurotransmission affectées de manière commune par la malnutrition et le stress dont les altérations conduisent, d'une part, à des désordres cognitifs et, d'autre part, à des dysfonctions métaboliques.

Par ailleurs, en dehors d'être une source d'énergie, les nutriments contenus dans les aliments modulent la physiologie de l'organisme par divers mécanismes, y compris via la stimulation des récepteurs membranaire et l'activation des voies de signalisation intracellulaire ainsi qu'en régulant l'expression génique. A cet égard, les acides gras polyinsaturés à chaîne longue (n-3 LC-PUFA), l'acide docosahexaénoïque (DHA), et l'acide eicosapentaénoïque (EPA), sont parmi les nutriments les plus étudiées. En fait, un grand nombre d'études suggère que la consommation d'aliments enrichis en EPA et DHA, ou la supplémentation nutritionnelle avec ces acides gras polyinsaturés, peut avoir des effets favorables sur la santé. Ces effets comprennent la prévention des déficits cognitifs associés à des maladies neurologiques et au vieillissement et l'amélioration du syndrome métabolique. Toutefois, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les effets bénéfiques du DHA et de l'EPA sur la santé ne sont pas bien compris.

L'un des objectifs de ce projet est de déterminer le rôle potentiel du tryptophane en tant que facteur programmeur commun des désordres métaboliques et neuropsychiatriques induits par la malnutrition parentale chez la progéniture en utilisant le rat comme modèle expérimental. Nous cherchons également à déterminer si la supplémentation maternelle en DHA prévient les effets délétères de la programmation métabolique ainsi qu'à élucider si ces effets protecteurs impliquent une modification du métabolisme du tryptophane et peuvent être transmis aux aniaux de la deuxième génération.

Au total, 1158 rats de la souche Wistar seront utilisés pour nos expériences. Ce nombre a été déterminé en appliquant de manière stricte les critères de la règle des 3R, à savoir, réduire, raffiner, remplacement. Ainsi, nous allons utiliser le nombre d'animaux minimum nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement interprétables tenant compte de la variabilité interindividuelle et du type de test statistique qui sera appliqué. Ce nombre est de $n = 14$ pour les études comportementales et de $n = 11$ pour les analyses biochimiques et moléculaires. De plus, nous avons structuré le projet de façon à utiliser, autant que possible, le même animal pour les analyses comportementales, biochimiques et moléculaires.

Par ailleurs, les conditions d'hébergement des animaux ont été « raffinées » tout au long de la durée du protocole de façon à assurer leur bien-être et de leur éviter au maximum de la douleur et des souffrances. Enfin, le but de notre projet étant d'établir un lien de cause à effet entre des modifications moléculaires dans les tissus et des altérations comportementales ou métaboliques au

niveau de l'organisme entier, il n'existe pas, malheureusement, de méthodes nous permettant de remplacer les analyses chez les animaux par d'autres méthodes d'expérimentation.

11778 Chaque année, 1 million d'Européens ont recours à la chirurgie de reconstruction osseuse pour la réparation de blessures, de maladies osseuses ou de problèmes liés à l'âge. Lors la perte osseuse est trop importante, la seule solution est la greffe osseuse. L'autogreffe est la procédure la plus efficace et la plus sûre car l'os contient les cellules et les protéines du patient. Cependant cette procédure est limitée par la quantité d'os disponible pour le prélèvement ; de plus, elle entraîne des douleurs post-opératoires importantes et des complications potentielles. L'utilisation de greffes d'os issues de banques de donneurs est possible mais les procédures de décontamination et de stérilisation entraînent une diminution de l'efficacité. Les biomatériaux synthétiques de comblement osseux représentent une nouvelle approche de reconstruction osseuse. Des biocéramiques sous forme de granules ont montré une amélioration de la repousse osseuse jusqu'à un comblement total lors d'implantation sur des défauts dits critiques, c'est-à-dire dont la taille ne permet pas une repousse naturelle, en comparaison aux défauts laissés vides. Cependant, cette étude a également montré que la présence d'un polymère servant d'épaississant à ces dispositifs entraînait une inflammation locale systématique. Le but de cette étude est d'améliorer le procédé de fabrication de ces biocéramiques de comblement osseux, en évaluant l'effet de différentes filtrations et de différents grades de polymères sur l'inflammation locale après implantation. Le but est de trouver un procédé de fabrication optimal permettant de diminuer voire d'éliminer l'inflammation.

Pour cette étude, les différents procédés de fabrication seront évalués en comblement d'un défaut osseux créé sur l'épiphyse fémorale de rats Sprague Dawley. Les rats seront implantés sur les deux pattes avec un même matériau, puis suivis durant 4 semaines avant explantation. L'inflammation locale sera évaluée quotidiennement, et macroscopiquement lors de l'explantation et par histologie ainsi que la repousse osseuse. Au total, 14 groupes sont nécessaires, avec 4 rats par groupes implantés sur chaque patte, ce qui permet d'obtenir n=8 échantillons par groupe, et donc d'avoir des résultats analysables statistiquement. Un délai de 4 semaines permet d'obtenir des résultats sur l'inflammation post implantation et donc de vérifier rapidement les effets des différentes formulations sur l'inflammation locale.

Règle des 3R :

Remplacer : la réaction inflammatoire est un processus vivant et dynamique, mettant en jeu des mécanismes complets qui ne peuvent être reproduits *in vitro*. L'évaluation de la réaction inflammatoire d'un biomatériau ne peut donc être effectuée qu'*in vivo*.

Réduire : 4 rats sont implantés par condition et par délai sur les 2 membres postérieurs. Ceci nous permet d'obtenir 8 échantillons par condition et par délai. Au cas où un animal serait écarté prématurément de l'étude, il restera 6 échantillons, ce qui est le nombre minimum nous permettant d'obtenir des résultats statistiques solides. Il n'est pas possible de mettre des échantillons différents sur les deux pattes des rats, car s'il y a réaction inflammatoire importante à un échantillon, cette réaction pourrait avoir une influence sur la réaction de l'autre membre.

Raffiner : les rats auront une période d'acclimatation d'au moins une semaine avant l'implantation. Ils seront hébergés dans une animalerie conventionnée, avec eau et alimentation *ad libitum*, dans des conditions de température et d'hygrométrie contrôlée, avec un cycle jour/nuit de 12h. Les animaux seront hébergés à raison de 3 rats par cage, ce qui permettra de conserver un comportement social naturel. Un enrichissement sera apporté par des cubes spéciaux.

Les rats seront implantés sous anesthésie générale avec analgésie pré-opératoire et post-opératoire. Les animaux seront suivis quotidiennement la première semaine, puis tous les 2 jours les semaines suivantes, et la douleur et le bien-être sont évalués selon des paramètres précis. En cas de signe de douleur importante, des antalgiques seront administrés jusqu'à disparition des signes. En cas de persistance des signes > à 48h, ou d'une baisse de poids trop importante, les animaux seront écartés de l'étude et euthanasiés.

11779 Le système endocannabinoïde est impliqué dans le contrôle des comportements sociaux (interactions sociales, motivation sexuelle), émotionnels (apparition de troubles anxieux et dépressifs) ainsi que dans certains processus cognitifs notamment ceux impliquant l'hippocampe.

Au laboratoire, nous avons étudié le rôle des endocannabinoïdes dans les comportements sociaux à la fois par une approche pharmacologique et par une approche génétique. Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence que le blocage du système endocannabinoïde entraîne une diminution des interactions sociales entre congénères mais également une altération de la motivation et des performances sexuelles. En parallèle, d'autres travaux ont montrés une perturbation de comportements émotionnels et cognitifs dans les mêmes conditions expérimentales.

Dans le cadre de notre thématique sur les interactions gènes/environnement, nous souhaitons poursuivre notre projet de recherche sur le rôle des endocannabinoïdes. L'objectif de ce projet est d'étudier l'influence de l'environnement périnatal sur le développement de souris présentant un système endocannabinoïde génétiquement inhibé (souris dont le récepteur aux endocannabinoïdes CB1 a été délété, CB1-KO) afin de déterminer s'il est possible de réduire les conséquences de l'inhibition du système endocannabinoïde. Pour cela, nous envisageons de modifier l'environnement périnatal animaux (enrichissement maternel) mais également d'agir pharmacologiquement et d'analyser les conséquences comportementales de ces manipulations à différents stades du développement (nouveau-né, adolescent, adulte).

Lorsque l'on veut étudier les troubles comportementaux liés à des perturbations neurobiologiques et les facteurs environnementaux et/ou pharmacologiques susceptibles de les atténuer, il n'y a pas de solution de remplacement à l'utilisation des animaux. Néanmoins, afin de réduire le nombre d'animaux, les différents tests comportementaux sont réalisés sur les mêmes souris, espacés de 24h au moins et toujours dans le même ordre afin de rendre les différentes expériences comparables. Etant donné la variabilité interindividuelle existant dans le comportement des souris, un effectif par groupe de 12 animaux au moins est nécessaire soit 48 (4 groupes selon le génotype et l'enrichissement maternel) par âge (3 âges donc 144) pour chaque condition expérimentale lors de l'expérience sur l'effet de l'enrichissement.

Pour les expériences pharmacologiques, seuls 2 âges seront étudiés (adolescent et adulte) mais avec l'utilisation de 2 batches pour chaque âge (soit $48 \times 4 = 192$ souris). Néanmoins, les tests comportementaux seront réalisés en 2 batches : un pour les test sociaux (48) et un pour les tests émotionnels et cognitifs (48) pour les 2 âges donc 192 souris. Pour les tests, 20 souris NMRI seront nécessaires.

Soit un total de 386 souris.

Afin de limiter au maximum le stress des animaux, une habituation à l'expérimentateur par manipulation quotidienne légère est réalisée. Un seul expérimentateur manipule les animaux pendant toute la durée de l'expérience. Aucun des tests comportementaux n'est invasif, douloureux ou ne nécessite de privation alimentaire ou hydrique. Les animaux sont habitués à la pièce expérimentale et au dispositif. Tout ceci diminue le stress des animaux et améliore la fiabilité des tests comportementaux.

11780 Le pancréas joue un rôle clef dans l'homéostasie nutritionnelle par la synthèse et la sécrétion d'hormones et d'enzymes digestifs. Cet organe inclut des cellules endocrines et exocrines. Le pancréas exocrine se compose de cellules acinaires et canalaire, alors que les cellules endocrines sont regroupées en des îlots de Langerhans. Ces derniers correspondent à des micro-organes spécialisés composés de quatre différents types de cellules : alpha, bêta, delta, et PP produisant les hormones glucagon, insuline, somatostatine et PP (polypeptide pancréatique), respectivement. L'insuline et le glucagon fonctionnent de façon coordonnée pour contrôler l'homéostasie du glucose (ou glycémie), alors que la somatostatine et PP régulent la sécrétion d'autres hormones et d'enzymes exocrines.

Comprendre comment les cellules bêta sont générés au cours du développement, mais aussi à l'âge adulte, est une condition préalable à la conception de nouvelles thérapies de régénération

cellulaire dans le contexte de la recherche sur les diabètes de type 1 type 2, deux maladies résultantes in fine en la perte ou diminution importante du nombre de cellules bêta. Spécifiquement, notre recherche se concentre sur le diabète de type 1, une maladie auto-immune qui se caractérise par la perte sélective de cellules bêta. Sans traitement, cette condition peut avoir de graves conséquences telles que des dommages vasculaires, des risques de cécité, d'amputation, ou même la mort. Les traitements actuels consistent en l'injection d'insuline exogène pour compenser la déficience en cette hormone. Cependant, les facteurs environnementaux tels que l'exercice, le régime alimentaire, la grossesse, ou l'âge, peuvent provoquer de fortes variations dans les niveaux de glucose sanguin, malgré un traitement à l'insuline, et donc éventuellement conduire aux complications présentées précédemment. La transplantation d'îlots représente un substitut au traitement à l'insuline mais la pénurie de donneurs empêche son utilisation généralisée.

Ainsi, d'autres alternatives doivent être développés afin de traiter efficacement les conséquences du diabète. Dans ce but, nous avons récemment montré que l'expression forcée du gène Pax4 dans les cellules alpha pancréatiques résulte en leur régénération et conversion en cellules « beta-like » fonctionnelles capable de « soigner » *in vivo* un diabète induit de façon chimique. Une caractérisation des mécanismes impliqués démontra l'implication du gène Gfi1. Afin de mieux caractériser les effets dans le pancréas, nous avons généré des animaux permettant la perte ou l'acquisition de fonction des gènes Pax4 et Gfi1 dans le pancréas. De façon surprenante, nos résultats d'expériences pilotes suggèrent que certaines de ces souris présentent une augmentation du nombre de cellules produisant l'insuline, une amélioration de la tolérance au glucose ainsi qu'une sensibilité à l'insuline significativement augmentée. Il est intéressant de noter qu'une telle augmentation est aussi visible dans l'intestin. Il est alors difficile de savoir si les effets observés sont causés par la contribution intestinale ou pancréatique. Pour solutionner ce problème, nous proposons de réaliser des expériences de pancréatectomie partielle afin de diminuer sensiblement les effets pancréatiques potentiels et donc de mettre en lumière le rôle des cellules endocrines intestinales.

Nous prévoyons d'utiliser 1280 souris pour l'ensemble de ce projet qui répond aux exigences de la règle des 3 R :

Remplacement : les effets métaboliques analysés sur le long terme requièrent un système biologique intégré tel qu'un organisme vivant. Ceci ne peut malheureusement pas être modélisé *in vitro*.

Réduction : Nous utiliserons un nombre d'animaux aussi faible que possible. L'application de tests statistiques nous permettra de réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire à l'obtention de résultats significatifs et exploitables et sans prévoir répétition des expériences.

Raffinement : Durant toute la procédure, les animaux seront suivis en s'appuyant sur une grille de score permettant d'évaluer et d'objectiver les éventuelles souffrances, et de mettre en œuvre des points limites précoces et adaptés. En amont de la procédure, des dispositions (habituation) sont prises pour minimiser tout stress aux animaux.

11781 Des études ont montré que le système nerveux périphérique pouvait réguler le système immunitaire via la libération des neurotransmetteurs (tels que l'acétylcholine ou la noradrénaline) lors de la stimulation de nerfs périphériques. Il a ainsi été montré que les organes lymphoïdes secondaires reçoivent une innervation importante de nerfs périphériques. Par ailleurs, on peut détecter l'expression de récepteurs à des neurotransmetteurs par les cellules du système immunitaire qui pourraient expliquer l'action de ces neurotransmetteurs. Dès lors, l'intervention sur l'activité des nerfs périphériques, dans le but de modifier l'activité du système immunitaire, est envisageable. Ainsi, chez l'homme la stimulation de nerfs périphériques avec des micro-stimulateurs implantés sur le nerf vague est réalisée chez des patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques tels que la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn.

Dès lors, on peut se demander si cette nouvelle approche ne serait pas aussi efficace dans d'autres maladies immunitaires inflammatoires comme les inflammations cutanées telle que le psoriasis. Le psoriasis est une dérégulation de la fonction dermique liée à un état inflammatoire caractérisé par

la présence de plaques rouges présentant des squames blanches. Cette affection chronique ne se guérit pas et peut être source d'une grande souffrance et socialement handicapante pour les patients. Les traitements actuels des formes peu étendues du psoriasis reposent sur l'utilisation d'agents anti-inflammatoires locaux, comme les corticoïdes. Cependant, quand ces traitements locaux ne suffisent plus, des traitements immunosuppresseurs généraux (méthotrexate ou ciclosporine) sont proposés. Dans ce cas, l'utilisation de l'électrostimulation pour traiter cette maladie pourrait être d'autant plus pertinente que nous avons montré que la stimulation des nerfs périphériques inhibe la sécrétion de TNF dans le sang. Or le TNF est une cytokine très importante impliquée dans le développement du psoriasis.

Nous cherchons donc dans ce projet à évaluer l'effet de l'électrostimulation de nerfs dans le territoire cutané sur le développement du psoriasis dans un modèle murin. Le projet consiste à :

- 1- implanter une électrode de stimulation sous-cutanée chez la souris ;
- 2- puis induire un psoriasis expérimental par application récurrente d'Imiquimod (aldara 5% crème) ;
- 3- et appliquer ou non des sessions d'électrostimulation.

La comparaison de l'étendue de l'inflammation entre les animaux ayant subi une électrostimulation (groupe expérimental) et ceux n'ayant pas subi cette électrostimulation (groupe contrôle) nous permettra de déterminer l'effet de l'électrostimulation sur le développement du psoriasis expérimental. Une fois l'effet thérapeutique établi, le mécanisme d'action sera recherché en utilisant des animaux transgéniques dépourvus de récepteurs aux deux neurotransmetteurs les plus fréquemment rencontrés pour la neuromodulation de la réponse immunitaire (récepteur beta 2 adrénergique et récepteur acétylcholinergique alpha 7).

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet est de 882. Des tests statistiques seront réalisés à la fin de chaque expérimentation pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs des raffinements sont proposés notamment pour limiter la souffrance animale en mettant en place des protocoles adaptés d'anesthésie et d'analgésie complétés par un suivi postopératoire comprenant la mise en place des points limites précoces et adaptés. L'utilisation de l'animal est indispensable à la conduite de cette étude car elle nécessite la préservation de l'intégrité du système nerveux et immunitaire

11782 Les pyélonéphrites sont une des principales infections bactériennes rencontrées dans les services de médecine urgences, et sont principalement dues aux entérobactéries et en particulier à *Escherichia coli*. Les fluoroquinolones sont indiquées aux urgences en traitement empirique, en cas de pyélonéphrite non grave. En cas d'exposition aux fluoroquinolones dans les 6 mois précédents, il est recommandé d'utiliser une céphalosporine de 3ème génération. Les céphalosporines de 3ème génération et les fluoroquinolones, tout comme l'amoxicilline-acide clavulanique, sont inscrites par l'ANSM sur la liste des antibiotiques critiques fortement pourvoyeurs de résistances bactériennes. C'est pourquoi une désescalade thérapeutique est recommandée à la réception de l'antibiogramme, à savoir le remplacement de la fluoroquinolone ou de la C3G par une molécule à spectre plus restreint : amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique ou cotrimoxazole. L'efficacité d'un traitement court par amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique ou cotrimoxazole n'étant pas démontrée, cela impose une durée plus longue pour le traitement séquentiel (10 à 14 jours) par rapport à un traitement par fluoroquinolone ou C3G injectable seule (7 jours).

De nombreux travaux ont démontré le lien entre l'exposition aux antibiotiques et la résistance bactérienne. Des études pharmaco-épidémiologiques ont montré, qu'à l'échelle de populations, la résistance aux quinolones et la résistance aux céphalosporines de 3ème génération sont favorisées toutes deux par l'exposition aux quinolones et aux C3G.

La flore digestive, ou microbiote digestif, est le principal réservoir d'Entérobactéries résistantes aux antibiotiques. Des souches bactériennes résistantes peuvent être transmises avec échanges de gènes de résistance au sein du microbiote intestinal et ces transferts de gènes peuvent avoir lieu entre souches commensales et souches pathogènes, y compris entre des espèces bactériennes de phyla différents. Une étude expérimentale -utilisant le modèle murin de portage digestif de bactérie

multirésistante que nous allons utiliser- a montré qu'un traitement séquentiel par fluoroquinolone puis ceftriaxone ou clindamycine favorise plus le portage digestif d'Entérobactérie résistante aux quinolones qu'un traitement par fluoroquinolone seule. L'impact de la clindamycine et de la ceftriaxone est expliqué par leur action majeure sur le microbiote digestif, et en particulier sur sa composante anaérobie. Or, l'ampicilline a une action marquée sur la flore anaérobie digestive, favorisant la colonisation par des germes pathogènes comme *Clostridium difficile* ou des Entérocoques résistants à la vancomycine.

Lors de la désescalade de l'antibiothérapie des pyélonéphrites, le traitement par amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique ou cotrimoxazole pourrait ainsi favoriser le portage digestif d'Entérobactéries résistantes aux fluoroquinolones. Ceci n'a cependant pas été évalué.

Notre hypothèse est que la désescalade de l'antibiothérapie dans les pyélonéphrites pourrait favoriser le portage digestif d'Entérobactéries résistantes aux fluoroquinolones via l'exposition à différentes antibiothérapies successives. Aucune étude à ce jour n'a démontré qu'un traitement séquentiel avec désescalade diminuait la fréquence et/ou la durée du portage de bactéries résistantes aux antibiotiques par rapport à un traitement par fluoroquinolones seule.

Nous voulons dans ce travail comparer la capacité de différents schémas d'antibiothérapies à promouvoir le portage digestif de bactéries multirésistantes. Dans un modèle murin, nous comparerons différents schémas séquentiels : le traitement recommandé par ciprofloxacine relayé par de l'amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique ou cotrimoxazole (traitement probabiliste puis désescalade thérapeutique), à différents schémas de monothérapie : un traitement par ciprofloxacine seule, cotrimoxazole seule, amoxicilline seule, amoxicilline-acide clavulanique seule au traitement de référence (ceftriaxone seule) et à un groupe contrôle.

Un total de 108 animaux répartis en 9 groupes de 12 individus recevront durant le traitement antibiotique une épreuve de colonisation par une souche d'*Escherichia coli* productrice de BLSE et résistante aux quinolones. Nous évaluerons le portage de bactéries résistantes par la mesure de la concentration de la souche bactérienne inoculée dans les selles à l'issue du traitement et de l'épreuve de colonisation. Au cours et à l'issue du traitement, nous évaluerons par des méthodes de séquençage haut-débit les modifications du microbiote digestif induites par ces différents schémas antibiotiques ainsi que leur association à un portage de bactéries multirésistantes. Par ce travail nous cherchons à confirmer ou non l'intérêt de la désescalade de l'antibiothérapie dans cette indication.

Ce protocole est établi en respect de la règle des 3R. Les données de la littérature expérimentale rapportent un nombre minimal de 12 animaux par groupe pour atteindre une puissance statistique satisfaisante. Les techniques *in vitro* ne permettent pas d'obtenir des données fiables sur l'activité *in vivo* d'une molécule et sur le potentiel de sélection d'une souche bactérienne résistante notamment au sein du microbiote intestinal. La corrélation *in vitro* - *in vivo* n'étant pas satisfaisante, et l'étude chez l'Homme non réalisable, le recours à l'utilisation de modèles animaux est donc indispensable. De plus, l'écosystème complexe du microbiote digestif n'est à ce jour pas techniquement reproductible *in vitro*. Enfin, les souris seront hébergées dans des cages individuelles, selon les règles de bonne pratique d'étude du microbiote, afin de limiter les contaminations interindividuelles. En effet, il est nécessaire de limiter les contaminations interindividuelles du microbiote digestif, notamment par coprophagie, qui pourraient biaiser les résultats de cette expérimentation. Les cages seront donc enrichies afin de d'améliorer les conditions d'hébergement et de limiter les effets négatifs de cet isolement. Enfin, une anesthésie sera effectuée devant tout geste invasif et les points d'arrêts définis de façon anticipée. Les animaux bénéficieront d'une semaine d'habituation.

11783 Le développement de nanoparticules pour la délivrance de médicaments ou d'agents d'imagerie dans le contexte de la nanomédecine rencontre un intérêt croissant. Dans ce contexte, une étroite collaboration établie avec des équipes de chimistes nous amènent à valider, par imagerie *in vivo*, différentes formulations de nanoparticules afin d'une part d'imager leur biodistribution et d'autre part de mesurer leurs performances diagnostiques. Avant d'envisager une étude chez l'animal, l'absence de toxicité des nanoparticules sera vérifiée. Nous travaillerons avec des souris qui auront

une tumeur sous cutanée. Cette tumeur sera obtenue après l'injection de cellules cancéreuses génétiquement modifiées sous la peau.

La demande des chimistes étant de plus en plus importante, nous prévoyons de tester une dizaine de nanoparticules par an, à raison de 6 souris par lots, soit 60 souris par an. Le projet étant sur 5 ans, soit un total de 300 souris.

L'utilisation des animaux est indispensable pour reproduire les mécanismes complexes liés aux tumeurs et il n'y a pas d'autres alternatives pour étudier la bio distribution d'une molécule. Seules les nanoparticules ayant un réel intérêt seront testées chez l'animal. Les techniques d'imagerie que nous utilisons sont non invasives et permettent de réaliser un suivi dans le temps sur un même animal, ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés au final. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et un enrichissement du milieu est fourni par l'animalerie. Toutes les procédures sont réalisées sur animal anesthésié et lors de l'anesthésie les animaux sont placés sur un tapis chauffant. Les animaux sont quotidiennement suivis par le personnel de l'animalerie en étroite collaboration avec l'expérimentateur. Au moindre signe de souffrance et/ou de mal être de l'animal l'expérimentation sera stoppée. Ces signes sont les suivants : nécrose de la tumeur, gêne occasionnée par la tumeur (dans le déplacement notamment), comportement anormal de l'animal (isolation, prostration, arrêt du toilettage).

11784 L'arthrose et les neuropathies sont des maladies chroniques présentant un fort impact sur la qualité de vie des patients. Il est très fréquent, dans ces pathologies, que la mobilité soit fortement diminuée entraînant des conséquences dans la vie personnelle et professionnelle des patients ainsi qu'un coût économique important pour la société. La prise en charge médicamenteuse de ces maladies est à terme souvent d'une efficacité relative et peut présenter des effets indésirables importants. Il est donc indispensable de trouver des nouvelles stratégies thérapeutiques pour la prise en charge de ces deux pathologies.

Deux stratégies sont actuellement évaluées afin de contrecarrer les difficultés de mouvements liées aux pathologies étudiées. La première est le blocage d'un canal calcique qui est une protéine impliquée dans la transmission et la perception du message nerveux. La seconde est l'inhibition de l'angiogenèse qui est un phénomène retrouvé au niveau articulaire (création de nouveaux vaisseaux sanguins) lors d'une arthrose et qui participe à cette pathologie.

Afin de pouvoir proposer de telles stratégies en clinique, la preuve d'une potentielle efficacité est nécessaire en préclinique.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer sur les paramètres locomoteurs (1) le blocage du canal calcique dans un contexte neuropathique et arthrosique et (2) l'inhibition de l'angiogenèse dans un contexte arthrosique.

Pour répondre à cet objectif des souris et rats, mâles et femelles seront utilisés. Le nombre total d'animaux prévu est de 660. Ce nombre a fait l'objet d'une évaluation précise décrite la partie technique en prenant en compte le bien-être animal et les impératifs scientifiques/statistiques liés au projet. Les animaux seront surveillés quotidiennement. Si leur état général se dégrade, des mesures correctrices seront mises en places par les soigneurs.

Notre projet suit au mieux la règle des « 3R ». Le remplacement par des méthodes alternatives n'est pas possible car l'étude de la locomotion n'est possible que dans un modèle vivant intégré possédant un système nerveux développé. Dans une logique de réduction du nombre d'animaux utilisés, ce nombre a été calculé en réalisant une étude bibliographique approfondie pour ne pas effectuer des expériences en double ainsi que par une méthodologie rigoureuse et des calculs statistiques appropriés. De plus, la marche des animaux sera évaluée à différents temps sur un même animal afin de réduire le nombre d'animaux par expérimentations. Enfin, une stratégie séquentielle sera utilisée : si les résultats sont négatifs pour une expérimentation clé alors les expérimentations qui en découlent ne seront pas réalisées. Le raffinement reposera tout d'abord sur un hébergement et une surveillance renforcée ainsi que sur l'élaboration de protocoles prenant en compte au maximum le bien-être animal.

11785 Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont à l'origine de toutes les cellules du sang et assurent leur renouvellement en continue. Afin de répondre à l'homéostasie ou à un stress, ces cellules peuvent sortir de leur état latent, proliférer et se différencier en deux grands lignages de cellules : les myéloïdes et les lymphoïdes. Les CSH sont capables de reconnaître directement certains pathogènes ou cytokines inflammatoires produites sur le site d'infection et d'y répondre directement en proliférant et en se différenciant, principalement vers le lignage myéloïde. Ce phénomène est appelé myelopoïese d'urgence.

Les cellules immunitaires peuvent garder en mémoire une infection passée afin de répondre plus efficacement à une seconde stimulation. Cette mémoire implique des modifications génétiques dans les lymphocytes. Mais il a récemment été montré dans les macrophages, qui sont des cellules myéloïdes, que la mémoire immunitaire peut être de nature épigénétique, c'est à dire des modifications de la conformation de la structure 3D de l'ADN qui peut impacter l'expression génique (par exemple : méthylation de l'ADN et modification des histones). Pour être en cohérence avec le principe d'immunité, une telle mémoire doit être présente dans des cellules qui ont une longue durée de vie. Comme c'est le cas des CSH, qui sont maintenues tout au long de la vie de l'individu, nous allons regarder si les CSH possède cette mémoire.

Les objectifs de ce projet sont :

- 1/ De déterminer si les CSH sont capables de répondre plus efficacement à une deuxième stimulation comme c'est le cas des macrophages
- 2/ D'identifier les modifications moléculaires et épigénétiques induites par les stimuli extérieurs dans la CSH.
- 3/ Déterminer l'importance et le rôle des facteurs de transcription myéloïdes dans la mise en place de la mémoire
- 4/ Déterminer si ces modifications épigénétiques sont transmises aux cellules filles effectrices tel que les macrophages lors de la différenciation des CSH.
- 5/ Analyser l'effet de différents stimuli sur la mise en place de la mémoire, voir si la mémoire immunitaire est spécifique à un type de stimuli et sur l'expression des facteurs de transcriptions hématopoïétiques. Les stimuli seront de différents origines : bactérienne (LPS), viral (poly : IC), inflammatoire (MCSF, Il1b, Tnfa), fongique (b-glucan).

La règle des 3R sera respectée dans ce projet :

Remplacement : Dans l'impossibilité d'obtenir des échantillons de cellules souches hématopoïétique de moelle osseuse d'humains (nécessitant des prélèvements invasifs), l'utilisation de modèles animaux est indispensable. Ne pouvant donc pas remplacer le modèle murin, nous réduirons autant que possible leur utilisation.

Réduction : Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux pour chaque groupe, nécessaire à la réalisation d'un test statistique paramétrique, soit un total de souris, mâles et femelles.

Raffinement : Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subie par les souris afin d'obtenir des données qui soient le moins biaisées possible par le "mal être" de l'animal. Une anesthésie générale sera utilisée durant les procédures expérimentales (prélèvement sanguin et transplantation). Nous vérifierons l'état de santé des souris quotidiennement : tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation) sera relevé et évalué grâce à une grille d'évaluation de la douleur. Lorsque les souris présenteront une perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids maximum ou si des signes cliniques apparaissent, les animaux seront mis à mort. Durant l'ensemble de l'étude, les souris seront hébergées dans des conditions conformes à la réglementation européenne en vigueur (environnement contrôlé : température et ventilation régulées, lumière avec un cycle de 12h, hygrométrie), avec un accès continu à la nourriture et à l'eau. Les souris seront maintenues en groupes de 3 à 5 animaux par cage. L'environnement est enrichi par des dômes en carton ou du coton. Le nombre d'animaux nécessaires pour l'expérimentation sur 5 ans s'élève à 1846 animaux.

11786 Tau est une protéine qui stabilise les microtubules, structures clé du squelette intracellulaire. Elle est abondante dans le système nerveux central, et beaucoup plus rare ailleurs. Cette protéine est impliquée dans les processus de transport intracellulaire, particulièrement axonal. Des mutations de cette protéine sont retrouvées dans de nombreuses pathologies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la démence frontotemporale. Il n'existe malheureusement pas de méthode alternative pour reproduire la pathologie associée à une tau déficiente, ou tauopathie. Les cellules doivent exprimer la protéine mutée. La maladie est progressive, le modèle doit donc être conservé plusieurs semaines, ou la pathologie artificiellement induite. De plus, tous les types de neurones ne sont pas affectés de la même façon par la pathologie. Le modèle expérimental doit donc conserver les différents types de neurones observés dans le cerveau. Ces trois caractéristiques font qu'un système de cellules immortalisées ne peut pas être utilisé pour étudier cette pathologie, ce qui justifie l'emploi de souris transgéniques. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés et de la souffrance animale, nous avons décidé d'utiliser le modèle suivant : la tranche de cerveaux en culture, obtenue sur des animaux transgéniques jeunes (donc avant apparition des symptômes), et dans lesquelles la pathologie sera induite. La lignée transgénique qui sera utilisée, et qui fait l'objet de cette saisine, présente un phénotype pathologique proche celui observé chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ce phénotype a une évolution rapide, avec des répercussions cellulaires constatées dès 3 mois. Le choix de cette lignée est justifié par le modèle expérimental, la tranche d'hippocampe (région cérébrale impliquée dans la mémoire) en culture, qui implique l'utilisation d'animaux jeunes, et d'une mutation pouvant se développer sur quelques semaines *in vitro*. L'animal hemizygote présente un phénotype nocif progressif, qui commence par une faiblesse musculaire pour évoluer vers une paralysie à 10 mois avec impossibilité de se nourrir. Les souris ont une espérance de vie de 12 mois. Une dégénération neuronale est constatée dans l'hippocampe à 8 mois. La fonction synaptique est significativement dégradée à 6 mois. Le but de ce projet est l'entretien de la lignée murine transgénique surexprimant le gène humain MAPT T34 portant la mutation P301S. Le nombre d'animaux produits pour entretenir et valider cette lignée sera d'environ 320, mâles transgéniques et femelles wild type compris. Dans le cadre du respect de la règle des 3R, pour diminuer le nombre d'animaux, la production sera contrôlée par l'établissement utilisateur. De plus, les animaux seront maintenus en environnement enrichi (présence de nid en papier dans la cage) afin de réduire le niveau de stress de l'animal. A titre informatif, le modèle d'étude choisi pour les expériences en aval, la tranche en culture, permet 1-une diminution importante du nombre d'animaux utilisés par rapport à l'expérimentation sur animal adulte, et 2-la diminution de la souffrance animale, la souris transgénique étant sacrifiée avant que la pathologie n'apparaisse. La production se fera en croisant des mâles hemizygotes pour la mutation et des femelles wild type. Les mâles reproducteurs hemizygotes feront l'objet d'une surveillance quotidienne afin de leur assurer une vie sans souffrance. Nous planifions de les sacrifier à 6 mois, mais ce point pourra être ajusté en fonction du bien-être de l'animal.

11787 L'utilisation des animaux de laboratoire dans les procédures faiblement invasives et invasives est strictement encadrée par la loi. La bonne pratique d'expérimentation nécessite une bonne connaissance de la biologie des espèces utilisées et aussi la connaissance théorique et pratique des méthodes d'exploration sur le modèle animal. L'objectif de ce projet est de fournir des connaissances indispensables et d'enseigner les bonnes pratiques d'expérimentation animale.

Dans notre société, chaque technicien doit maîtriser les techniques d'administration et de prélèvement, chez le rat et la souris, ainsi que les techniques de chirurgie utilisées dans l'entreprise.

La formation initiale ainsi que le maintien des compétences de chaque technicien seront encadrées par les organismes agréés mais aussi par le personnel compétent au sein de l'entreprise et se fait dans le respect des recommandations du CNEA. Le vétérinaire référent peut aussi assurer la formation et la validation des compétences en anesthésie, analgésie, chirurgie et mise à mort.

Notre projet prévoit donc l'apprentissage des nouvelles techniques et le maintien des compétences pour tous les techniciens en expérimentation animale (environ 9 personnes et 9 techniques).

Les formations nécessiteront au maximum 1000 souris et 200 rats sur 5 ans.

Application du principe des 3Rs :

Réduction : nous utiliserons en priorité des animaux surnuméraires des études, des animaux issus de nos élevages non entrés en expérimentation (souris uniquement) plutôt que des animaux achetés chez des fournisseurs agréés. Différentes procédures faiblement invasives, telles que les administrations et les prélèvements seront réalisées plusieurs fois sur les mêmes animaux tout en respectant les limites maximales recommandées par le GIRCOR.

Raffinement : seront utilisés exclusivement des animaux en bon état général, hébergés dans des conditions respectant le bien-être animal, sous atmosphère contrôlée (température, hygrométrie, fond sonore...), avec l'enrichissement du milieu adéquat (fibre pour nidification, rouleau carton...). L'état sanitaire des animaux sera régulièrement évalué par la personne chargée du bien-être des animaux. L'atteinte des points limites conduira à la mise à mort des animaux concernés.

Remplacement : Il existe peu de solution de remplacement permettant la formation et le maintien des compétences du personnel. L'utilisation de l'animal vivant est indispensable pour ressentir les différences anatomiques inter individu, la force et les réactions de celui-ci. Avant toute manipulation des animaux, le personnel concerné procède à la lecture des procédures descriptives des techniques pour lesquelles il doit être formé.

Afin de s'assurer que les animaux ne souffrent pas pendant ces procédures, tous les prélèvements seront faits sous anesthésie gazeuse. Les animaux seront observés tous les jours et des points limites sont mis en place pour éviter toute souffrance.

11788 L'obésité chez le chien est un problème d'importance croissante et la diminution de la prévalence de cette affection est un enjeu majeur de la médecine vétérinaire.

L'obésité résulte d'un excès d'apports énergétiques en regard des dépenses énergétiques. Ainsi toute intervention permettant de diminuer les apports et/ou d'augmenter la dépense énergétique pourrait être utile.

De récents travaux ont montré que le microbiote pouvait être impliqué dans la physiologie de l'hôte, notamment dans la régulation énergétique. Parmi les mécanismes décrits, la production par des bactéries d'un peptide, la ClpB, pouvant moduler la prise alimentaire a été caractérisée. De par son homologie avec une molécule endogène, l'alpha-MSH, ce peptide réduit la prise alimentaire en induisant une satiété précoce. Ceci a été notamment mis en évidence chez les souris génétiquement obèses et hyperphagiques.

Mais tous les mécanismes exacts par lesquels l'ingestion de bactéries produisant la ClpB ne sont pas caractérisés.

Dans cette étude, nous nous proposons de mesurer l'efficacité d'une supplémentation en un probiotique issu de la technologie ProBioSatys (société Targedys) produisant la ClpB, sur la prise alimentaire quotidienne de chiens, et le cas échéant, de mettre en évidence, au moins en partie, les mécanismes sous-jacents.

Pour ce faire, nous envisageons de tester l'efficacité d'une supplémentation en probiotiques contenus dans des gélules et produisant l'alpha-MSH sur la prise alimentaire (paramètres principal) et le poids chez le chien. En cas de réduction de la prise alimentaire, nous mesurerons les concentrations plasmatiques en peptides impliqués dans ce comportement physiologique (paramètres secondaires) et si des modifications sont notées, nous évaluerons les modifications du microbiote induites par cette supplémentation en probiotiques.

L'étude portera sur 22 chiens. Les chiens seront répartis en un groupe témoin (n=11) recevant un placebo et un groupe expérimental (n=11) recevant le probiotique issu de la technologie ProBioSatys. Cette étude sera menée avec deux bras parallèles, permettant des mesures longitudinales où chaque chien sera son propre témoin. Ceci permet de limiter le nombre d'animaux.

La procédure d'administration des repas doit nous permettre de mettre en évidence d'éventuels effets à court terme, à moyen terme, sur la consommation lorsqu'est présentée une ration normale, ou lorsqu'est présentée une ration excessive.

La durée pendant laquelle une ration excessive est proposée est relativement courte (5 jours) ce qui évite les conséquences indésirables d'un régime hyperénergétique sur le poids.

La présentation de la ration sous forme de deux repas espacés de 3h doit permettre que les bactéries contenues dans la gélule libèrent la ClpB, et que cette dernière induise son effet satiétogène. Ainsi, se met-on dans les meilleures conditions pour observer un éventuel effet sur la satiété, ce qui serait sans aucun doute impossible si la ration était présentée en un repas unique. De plus, le fractionnement de la ration est une préconisation usuelle pour faciliter la perte de poids chez les chiens.

Ce projet respecte la règle des 3R

Remplacer : Aucune manipulation *in vitro* ne permet de mesurer l'influence d'une supplémentation nutritionnelle sur la prise alimentaire

Réduire : L'étude est menée de manière longitudinale, où chaque chien est son propre témoin. Un tel déroulé d'étude réduit le nombre d'animaux et permet une analyse statistique compte-tenu des variations interindividuelles importantes

Raffiner : le bien-être des animaux sera surveillé par leur observation quotidienne. Leur poids sera mesuré toutes les semaines. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales sont adaptées pour ne pas l'altérer. Les procédures expérimentales proposées ne sont pas d'ordre à perturber le bien-être animal.

11789 Chaque année, plus de 4 500 nouveaux cas de cancers de l'ovaire sont diagnostiqués en France. La chirurgie est le traitement de première intention du cancer de l'ovaire, hormis pour certaines formes évoluées. Lorsque la maladie est très avancée, la chimiothérapie est généralement combinée à la chirurgie. Avec plus de 3 000 décès par an, le cancer de l'ovaire est la 4^{ème} cause de décès par cancer en France chez la femme. En raison notamment du diagnostic souvent tardif, le pronostic reste sombre avec un taux de survie globale à 5 ans de 43% et à 10 ans de 31% (INCA 2015). C'est pourquoi, des stratégies thérapeutiques doivent donc être développées pour améliorer le résultat clinique. Pour ce type d'étude, puisqu'il est impossible d'obtenir des conclusions fiables *in vitro* nous ne pouvons actuellement nous passer des expérimentations conduites sur des animaux pouvant simuler les principales propriétés biologiques des cancers de l'ovaire avancés humains.

Dans le cadre des tumeurs gynécologiques (cancer du col, de l'endomètre et de l'ovaire) les modèles précliniques utilisés dans la découverte de médicaments ont principalement utilisé des lignées cellulaires clonales, qui ne peuvent pas expliquer l'hétérogénéité tumorale. L'étude préclinique des tumeurs qui ressemblent plus étroitement aux tumeurs humaines peut augmenter la probabilité que les médicaments efficaces dans les études précliniques soient efficaces dans les essais cliniques. Le modèle de xénogreffe (PDX) dérivé du patient, dans lequel des tumeurs sont prélevées sur des patients et immédiatement implantées sur des souris, a récemment été caractérisé et peut permettre un tel avantage. Il a récemment été montré que le modèle PDX peut être établi avec un taux de réussite élevé, permettant d'obtenir des profils d'expression et des activités biologiques similaires aux tumeurs des patients, et peut être utilisé comme modèle pour identifier la population chimiorésistante. Dans ce contexte, les prélèvements de tissu frais pourront être utilisés afin d'élaborer un modèle de xénogreffe pour les tumeurs solides gynécologiques (col, endomètre, ovaire).

Le but de ce projet est l'obtention d'une vingtaine de xénogreffes de cancers de l'ovaire chez la souris, caractérisée en termes de temps de progression, d'éventuel développement métastatique, de transplantations sériées et de réponse aux chimiothérapies conventionnelles (carboplatin ou paclitaxel). Dans le souci du respect de la règle des 3R, l'ensemble des procédures de transplantation sera réalisé sous anesthésie (isoflurane) associée à une analgésie (meloxicam) pré et post-opératoire afin d'éviter toute douleur. Afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des souris, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et coton), et par le maintien des animaux en groupes de 5 afin d'éviter le stress de l'isolement. De même, le nombre de souris a été

calculé afin de couvrir la diversité moléculaire des cancers de l'ovaire et de fournir des résultats statistiquement significatifs pour la prédiction de la réponse thérapeutique des différentes tumeurs ainsi établies. Ce projet d'établissement de banque de xénogreffes nécessitera donc 620 souris immunodéficientes de type NSG.

11790 L'objectif de cette demande d'expérimentation animale est de poursuivre notre étude sur la mise au point et l'optimisation d'un pansement osseux visant à accélérer la réparation osseuse après fracture ou perte de substance osseuse de petit volume. Les retards, ou les défauts de cicatrisation osseuse chez l'Homme sont fréquents et peuvent toucher à la fois des os longs et porteurs comme le tibia mais aussi des os de petite taille comme ceux de la main. Dans tous les cas ces pathologies sont invalidantes car douloureuses et retardent la reprise d'une activité normale. Nous avons montré pour la première fois lors de notre première expérimentation chez le rat, que le concept de pansement osseux, apposé sur une petite perte de substance et libérant localement des molécules favorisant la régénération osseuse, était une stratégie thérapeutique prometteuse car simple, efficace, facile à utiliser sur le plan chirurgical, et évitant l'administration de drogues par voie générale.

Ce programme a pour but de tester 3 pansements osseux (dont 2 nouveaux) qui seront apposés au contact d'une petite perte de substance osseuse au niveau du fémur chez le rat : 1) le premier pansement (C) sera constitué d'un tissu de carbone nu ; 2) le second pansement (C/HA) sera constitué du même tissu de carbone recouvert d'une couche mince d'hydroxyapatite (HA) qui mime la nature chimique minérale de l'os (pansement déjà testé dans notre expérience précédente) ; 3) le troisième pansement sera, en plus, enrichi en aspirine (C/HA/AA), agent décrit récemment pour favoriser la régénération osseuse. Les expériences de biocompatibilité et de toxicité que nous avons menées en amont *in vitro* en présence de cellules osseuses (ostéoblastes humains primaires) ont montré que ces trois types de pansement étaient biocompatibles. De plus, notre première expérience menée récemment chez le rat a montré 1) la faisabilité de cette stratégie chirurgicale ; 2) la parfaite tolérance locale et à court terme du biomatériau C/HA à nouveau inclus dans cette étude ; 3) l'efficacité de ces pansements pour accélérer la réparation osseuse.

Nous souhaitons utiliser à nouveau 53 rats. Tous les rats subiront une anesthésie générale et une analgésie pré et postopératoire. Après incision de la peau et séparation délicate des masses musculaires nous pratiquerons un défaut osseux cavitaire de 2,7 mm au niveau de l'extrémité inférieure de chaque fémur à l'aide d'une fraiseuse semblable à celles que l'on utilise en chirurgie dentaire. Dans le premier groupe le fémur opéré ne recevra pas de pansement, dans les 3 autres groupes nous apposerons un pansement en regard du défaut osseux. En fin d'expérience i.e. après 7 jours, 14 jours et 21 jours, les animaux seront sacrifiés et nous comparerons la réparation osseuse dans ces quatre groupes et aux différents temps par microscanner, imagerie par résonance magnétique (IRM), spectroscopie RAMAN et histologie. Nous espérons confirmer les résultats de notre première expérience à savoir que le comblement du défaut osseux est plus rapide en présence de pansement et nous déterminerons quel est le pansement le plus efficace. Un groupe de 2 rats servira de contrôle à J0 et un autre groupe de 3 rats sera maintenu en hébergement pendant 6 mois après la chirurgie pour tester la tolérance et la biodégradation de ces pansements de carbone à long terme.

Ce projet a été conçu dans le respect de la règle des 3R, i.e. remplacement, réduction et raffinement. Remplacement : il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes permettant d'éviter l'expérimentation animale pour tester le pouvoir ostéogénique de biomatériaux destinés à la reconstruction osseuse chez l'Homme.

Réduction : Ce modèle de petit défaut osseux bilatéral permet d'opérer les deux pattes du rat pour réduire de moitié le nombre d'animaux. Nous avons calculé le nombre minimum d'animaux par groupe, nombre permettant d'appliquer une analyse statistique significative.

Raffinement : Toutes les expériences et manipulations des animaux seront effectuées avec le souci de préserver le bien-être de l'animal : Par la combinaison d'anesthésies générale ; par l'application de protocole d'analgésie pré et post opératoire ; par le suivi des animaux selon une grille d'évaluation prévoyant le recours à des points limites précoces et adaptés. Le bon déroulement de

l'expérience que nous avons menée précédemment dans ce même modèle a permis de confirmer l'efficacité de ces mesures sur le bien-être des animaux utilisés.

11791 La mise en évidence de biomarqueurs sanguins, pourra permettre une discrimination plus précoce entre les patients répondeurs et réfractaires à l'efficacité des traitements anticancéreux. Nous venons de breveter et publier une nouvelle classe de biomarqueurs sanguins, dosable directement pendant la radiothérapie. Dans une étude clinique de phase II, l'augmentation de la céramide plasmique, un sphingolipide pro-apoptotique, a été corrélée pendant la radiothérapie avec la régression de métastases hépatiques ou pulmonaires, observées plus tardivement par imagerie médicale.

Nos résultats prometteurs peuvent permettre de faire évoluer la pratique clinique des oncologues en adaptant la dose de radiation ou en réorientant les patients vers d'autres traitements en fonction de leur réponse. Suite à ces premiers résultats, nous devons mieux comprendre les mécanismes de sécrétion de ces biomarqueurs en fonction de la dose de rayonnements utilisée. Ceci n'étant pas possible lors d'études cliniques, nous avons effectué une saisine où nous proposons de transplanter des tumeurs cérébrales 9L en sous-cutanées, chez des rats de type Fischer CDFTM. Les tumeurs engendrées devant être irradiées à des doses utilisées en clinique (de 0 à 20 Gy) et des prélèvements de sang étant réalisés régulièrement pendant 15 jours, afin de doser les sphingolipides. Ces travaux suivent la règle des 3 R : réduire, en utilisant seulement 3 doses d'irradiation différentes (faible/moyenne/forte) ; raffiner, en utilisant des points limites précis (fiches individualisés répertoriant les critères à prendre en considération) ; remplacer, ces études ne peuvent pas être remplacés par un modèle *in vitro*. Cependant, cette étude révèle que les tumeurs régressent spontanément du fait d'une réponse immunitaire exacerbée. Nous avons décidé d'arrêter ces expériences, et proposons de refaire les expériences en transplantant les tumeurs directement dans le cerveau des rats. Ce protocole a l'avantage de nous rapprocher de la réalité clinique. Du fait de la complexité de l'expérimentation, un nombre limité de doses sera utilisé (0, 2, 8, 15 Gy), et elles seront conjuguées avec des expériences de suivi de la réponse immunitaire de la tumeur irradiée. Cette application clinique est importante, car ces travaux permettront de déterminer la validité de cette nouvelle classe de biomarqueurs sphingolipidiques, ainsi que leur application aux nouveaux protocoles de radiothérapie. Afin de mener à bien ces expériences, un total de 180 rats sera nécessaire pour la réalisation du projet.

11792 La radiothérapie (RT) représente le deuxième traitement du cancer le plus utilisé après la chirurgie, avec 60% des patients pour qui il faut avoir recours à la RT. Or, si le but principal de ce traitement est de cibler et de détruire les cellules tumorales, l'un des effets secondaires présents est l'induction d'une réponse immunitaire. Cette réponse peut être très bénéfique et améliorer l'effet de la radiothérapie en participant à la destruction tumorale mais elle peut aussi, dans certains cas, être responsable des phénomènes de radiorésistance ou de rechute. De nombreuses études ont déjà démontré que la combinaison de la radiothérapie avec des immunothérapies permet d'améliorer l'effet thérapeutique chez les patients. Cependant, l'équilibre et le paradoxe de la réponse immunitaire anti-tumorale liée à l'efficacité et les mécanismes pro-tumoraux responsables de la rechute sont encore peu connus. De même, peu de recherches ont été menées sur l'optimisation des doses et des cycles de thérapies combinées. C'est pourquoi nous avons développé un projet permettant d'étudier la combinaison thérapeutique entre la radiothérapie et deux différents activateurs de la réponse immunitaire dans trois modèles murins de cancer.

Un des axes de l'étude consiste à optimiser les paramètres de la trithérapie comme les doses d'irradiation, les cycles de traitement avec les inhibiteurs et la durée des différents traitements. D'autre part, il nous est paru nécessaire d'analyser la réponse immunitaire mise en place pendant le traitement ainsi que son rôle dans l'efficacité de la trithérapie sur du long terme. Pour l'ensemble de ces axes d'étude, il est nécessaire de se placer dans un modèle vivant entier et dynamique dans lequel l'effet de la trithérapie et la réponse immunitaire pourront être analysés. En effet, la réponse immunitaire que nous souhaitons étudier ne se déroule pas uniquement au niveau du microenvironnement tumoral mais aussi dans le ganglion lymphatique drainant la tumeur. Les

échanges entre ces deux sites se passent principalement par le réseau sanguin dans lequel circule un nombre important d'acteurs immunologiques. Ce système complexe n'a donc pas, jusqu'à aujourd'hui, pu être remplacé par des techniques substitutives.

Les contraintes principales pour les animaux en procédure seront l'implantation de tumeurs et l'exposition localisée à des rayonnements ionisants (radiothérapie).

Nous avons mis en place des stratégies d'expérimentation et d'observation afin de réduire au minimum la souffrance et la douleur des animaux. Les souris seront hébergées en groupe pour minimiser le stress de l'isolement. De plus, l'environnement des animaux sera enrichi en permanence par du coton ou des nids en carton afin de diminuer leur angoisse et favoriser leur bien-être. Les points limites seront strictement appliqués. Le nombre d'animaux sera adapté pour atteindre les objectifs du projet et réduire au minimum le nombre d'animaux. En effet, une analyse statistique a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaire pour détecter des différences significatives tout en réduisant au minimum le nombre d'animaux, qui a été estimé au maximum à 1630 souris sur 4 ans. Les animaux seront surveillés quotidiennement et les points limite strictement appliqués. Tous les gestes techniques des procédures expérimentales seront faits sous anesthésie. Cette approche pourra notamment améliorer les modalités de traitement de patients affectés du cancer, en minimisant les effets secondaires associés à la radiothérapie.

11793 Dans les pays occidentaux, l'accident vasculaire cérébral (AVC) est une cause majeure de handicap acquis de l'adulte, la deuxième cause de démence après la maladie d'Alzheimer et la troisième cause de mortalité. L'insuffisance rénale chronique (IRC) favorise la survenue d'AVC et est à l'origine de complications neurologiques et d'affections cognitives qui appauvrissent la qualité de vie des patients et sont associées à un risque accru de mortalité. Les atteintes peuvent être motrices, sensitives, sensorielles et cognitives (avec notamment des troubles de la mémoire) et sont souvent associées à des syndromes dépressifs. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement de l'AVC en dehors de la thrombolyse et des traitements administrés en prévention secondaire. La prévention et le traitement des atteintes ischémiques conséquentes à la survenue de l'AVC sont donc des considérations importantes dans la prise en charge de personnes atteintes d'IRC. Le diabète et l'hypertension artérielle sont les causes les plus fréquentes de maladie rénale chronique. Ainsi, en France, 30 % des patients dialysés chroniques sont diabétiques. Des études menées par notre laboratoire montrent que la metformine, une molécule utilisée dans le traitement du diabète de type II pour ses effets normoglycémiant, présente des effets neuroprotecteurs suite à la survenue d'un AVC dans un contexte d'IRC. Nous nous attachons actuellement à identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces phénomènes. Le présent projet a pour but d'identifier les mécanismes par lesquels la metformine réduit la sévérité des atteintes ischémiques post-AVC chez la souris au cours de l'insuffisance rénale chronique (IRC). Pour répondre à cet objectif nous travaillerons sur des souris C57BL6J atteintes d'IRC (souris IRC) ou des souris contrôles (souris SHAM), traitées ou non par la metformine (200mg/Kg, dilué dans l'eau de boisson). Les souris seront donc réparties en quatre groupes : SHAM contrôle (n=19), SHAM metformine (n=19), IRC contrôle (n=23), IRC metformine (n=23). Après six semaines d'exposition à la metformine, les souris subiront un AVC. Trois jours après l'AVC les ARN messagers (ARNm) seront récupérés à partir des cerveaux de souris afin d'étudier les effets de la metformine sur la régulation des gènes impliqués dans la sévérité de l'ischémie cérébrale. La complexité des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'IRC et les AVC ne permet pas d'obtenir des données mécanistiques complètes en passant par des études *in vitro*, *ex vivo* ou *in silico*. En effet, les mécanismes de récupération post-AVC impliquent l'activation et l'action coordonnées de diverses cellules résidentes du cerveau (neurones, astrocytes, microglies, neuroblastes), qu'il nous est impossible de co-cultiver simultanément. Nous étudions par ailleurs les effets de l'IRC sur la récupération post-AVC, ce qui nécessiterait de reproduire *in vitro* le microenvironnement auquel sont confrontées les cellules résidentes du cerveau lorsque l'IRC et l'AVC surviennent simultanément (Conséquence d'une exposition au sérum urémique, altérations hémodynamiques globales, inflammation, ...), aspect qu'il nous est impossible de reproduire en laboratoire par des études *in vitro*, *ex vivo* ou *in silico*. Notre choix s'est porté sur l'utilisation d'un modèle animal car

notre laboratoire possède une grande expérience des modèles d'IRC et d'AVC chez la souris. Ces modèles ont fait l'objet de plusieurs publications internationales et sont reconnus par la communauté scientifique. Le nombre d'animaux nécessaire à l'étude (n=84) est maintenu au minimum pour permettre une analyse statistique des résultats et éviter une impossibilité de conclure par manque d'animaux dans des groupes expérimentaux. Toutes les précautions d'usage en termes d'analgésie et d'anesthésie seront prises afin de soulager et limiter la douleur des animaux lors des différentes expériences. Ainsi, après chaque chirurgie, les souris recevront une injection sous cutanée d'un antalgique opiacé et seront placées sur une couverture chauffante jusqu'à leur réveil. L'administration de l'antalgique sera répétée 6 à 8 heures après la première administration si les animaux montrent des signes de douleurs. La plus grande attention sera portée afin d'éviter la survenue de douleurs et de stress chez les animaux tout au long du protocole. Ainsi, après chaque chirurgie, l'état général des souris sera surveillé par une pesée (journalière dans la semaine post-chirurgie puis semi-hebdomadaire) et la recherche de signes de souffrance (observation visuelle, sept jours sur sept). Un enrichissement du milieu de stabulation (frisettes, dôme, roue, cylindre en carton) sera effectué pour favoriser le bien-être des animaux (raffinement).

11794 Les études épidémiologiques montrent que l'exposition à des pesticides favorise chez l'homme la maladie de Parkinson, ainsi que les déficits cognitifs, une composante essentielle de la maladie d'Alzheimer. La présence de plaques amyloïdes, l'une des lésions essentielles de la maladie d'Alzheimer constituée de protéine b-amyloïde, est très fréquente chez l'homme et peut précéder de plusieurs décennies les troubles de mémoire caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, dont la survenue ou l'aggravation pourraient être accélérées par l'exposition à des facteurs toxiques environnementaux. Malgré la présence de ces plaques certains sujets ne développeront pas de troubles de mémoire pendant de nombreuses années. Parallèlement, des travaux récents par croisements des souris génétiquement modifiées modèles de la maladie de Parkinson et d'Alzheimer, montrent que la présence dans le cerveau de plaques amyloïdes, augmente l'agrégation de la protéine alpha-synucléine, une protéine clé dans la maladie de Parkinson et dans certaines démences. De façon inattendue cette agrégation de l'alpha-synucléine jouerait un rôle très important dans le développement des déficits de mémoire lors de la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, notre étude contribuera ainsi aux travaux expérimentaux, encore très rares, permettant d'évaluer dans quelle mesure l'exposition à des pesticides pourrait contribuer au développement de la maladie. Nos travaux portent sur l'effet de l'exposition à un pesticide, le paraquat, dans l'eau de boisson de souris génétiquement modifiées issues d'un croisement entre des souris modèles de la maladie de Parkinson (« Park ») et des souris modèles de la maladie d'Alzheimer (« Alz »). Les souris (450 au total) seront exposées, ou non, au paraquat dans l'eau de boisson, de façon chronique et à faible dose, à partir de l'âge de 2 mois, et seront euthanasiées 1.5, 3 ou 6 mois après le début de l'exposition. Aucun signe clinique n'est a priori attendu chez ces souris pendant ce suivi. Après la mort des animaux, les cerveaux et les moelles épinières, ainsi que les intestins, seront prélevés pour des études biochimiques et histologiques, portant sur l'agrégation des deux protéines essentielles (alpha-synucléine et bêta-amyloïde, impliquées dans les maladies de Parkinson et d'Alzheimer respectivement) et sur les mécanismes qui peuvent l'accompagner dans le tissu nerveux (stress oxydatif et inflammation). Dans l'hypothèse où le croisement des souris « Park » et « Alz » aggraverait de façon très importante la pathologie de l'un des deux modèles de souris choisis, nous prévoyons, par précaution, des points limites et procéderons à l'euthanasie des animaux. La procédure du projet ne génère pas de douleur, de souffrance ni de stress pour les animaux. Les nombres d'animaux sont limités au minimum nécessaire à la validation statistique des résultats. Les animaux sont élevés dans des cages à environnement enrichi (igloo, Neslets). Les résultats du projet pourraient permettre d'envisager à terme des méthodes alternatives *ex vivo* reproduisant les marqueurs moléculaires d'intérêt révélés par ces travaux.

11795 Plusieurs milliers de femmes souffrent d'infertilité due à une absence d'utérus d'origine congénitale ou acquise. Pour ces femmes désireuses d'une grossesse, la transplantation utérine pourrait

devenir une piste thérapeutique. En effet, cette intervention réalisée à partir de donneuses vivantes apparentées a permis la naissance de 8 enfants bien portants en Suède sur 9 greffes.

Les lésions d'ischémie (perturbation de la circulation sanguine) et de reperfusion dues à une interruption d'irrigation du greffon sont une cause importante de retard de fonctionnement de celui-ci et de risque de rejet aigu. En transplantation utérine, le diagnostic de rejet se fait par biopsie cervicale, technique invasive génératrice de microtraumatismes tissulaires.

Notre objectif est d'identifier des marqueurs non invasifs d'ischémie et d'inflammation pour suivre l'évolution de ces processus pendant le prélèvement et après transplantation de l'utérus.

Nous avons réalisé deux études préalables nous permettant de maîtriser la technique opératoire de la greffe chez la brebis, modèle animal le plus pertinent de par sa taille et sa vascularisation utérine similaires à celle de la femme.

Notre critère de jugement principal est de corrélérer l'expression des marqueurs périphériques et l'état du greffon au 4^{ème} jour post-opératoire (J4 po). Cet objectif se décline en trois points, à savoir (i) l'évaluation des marqueurs d'ischémie et d'inflammation circulants pendant le prélèvement, la greffe et la reperfusion, (ii) l'évaluation des marqueurs d'ischémie et d'inflammation pendant la période post-opératoire et (iii) la corrélation entre l'expression des marqueurs non invasifs et l'état du greffon à J4 po.

Nous évaluerons également l'apport de la micro endoscopie confocale dans l'étude histologique du col et du vagin et nous comparerons les résultats à ceux obtenus par l'histologie.

Nous réaliserons deux procédures :

(A) : autogreffe utérine chez 20 brebis

(B) : laparotomie sans transplantation d'une durée de 6 heures chez 10 brebis (groupe contrôle).

Dans les deux groupes, l'hystérectomie (ablation de l'utérus) sera réalisée à J4 po.

Le nombre maximum de brebis nécessaire à cette étude est de 30 animaux : 20 brebis dans le groupe « autogreffe » et 10 brebis dans le groupe contrôle, compte tenu du taux d'échec de la greffe décrit dans la littérature (chirurgie et complications post-opératoires). Nous arrêterons les procédures quand 10 succès seront obtenus dans le groupe autogreffe et 5 succès dans le groupe contrôle. Nous considérons qu'une greffe est réussie si au moins une corne utérine est revascularisée (artère et veine perméables).

Les brebis seront maintenues dans l'unité expérimentale (bergerie) en conditions d'élevage traditionnel et en groupe jusqu'à la veille de l'intervention chirurgicale. Le soir précédant l'opération, les brebis concernées seront mises à jeun dans une case individuelle. Les animaux seront ensuite réveillés et surveillés étroitement en case individuelle (lampes chauffantes, monitoring de la température corporelle, antidouleur...), à proximité visuelle et olfactive des autres individus, l'environnement sera enrichi (pierre à sel, ambiance musicale). Ils recevront un traitement antidouleur, un traitement anticoagulant et des antibiotiques. Toutes les brebis seront suivies après chirurgie pendant 4 jours par des examens cliniques et para cliniques journaliers (imagerie échographique avec des mesures doppler des artères utérines) et des prélèvements sanguins seront réalisés afin d'évaluer les marqueurs sanguins d'ischémie/inflammation (H24, H48, H72 et H96). Des points limites cliniques et paracliniques seront définis afin d'éviter toute souffrance. Lorsque les brebis ne présentent pas de signes d'inconfort ou de souffrance, elles seront réopérées à J4 po afin d'évaluer la qualité du greffon. Elles seront euthanasiées à l'issue de l'intervention chirurgicale sans avoir été réveillées. La qualité fonctionnelle du greffon sera évaluée in situ par des techniques d'imagerie non invasives (échographie Doppler, micro endoscopie confocale) puis, après hystérectomie, par l'analyse de marqueurs cliniques (coloration de l'utérus, perméabilité des connexions (anastomoses) vasculaires), histologiques et moléculaires.

11796 Le Cancer du pancréas est la quatrième cause de mortalité par cancer dans le monde. Asymptomatique et métastatique, il n'existe à l'heure actuelle aucun moyen de le dépister à un stade précoce et au moment du diagnostic, l'espérance de vie du patient excède rarement 6 mois. L'urgence à laquelle la recherche est confrontée nous a amené à reconsidérer le rôle de drogues

bénéficiant déjà d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) au sein de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-tumorales.

Après une étude minutieuse des bases de données, la trifluoprazine a été sélectionnée et s'est avérée très efficace sur plusieurs lignées cellulaires issues d'adénocarcinomes pancréatiques humains. Capable d'arrêter le cycle cellulaire, de réduire la vitesse de prolifération cellulaire, de diminuer la capacité clonogénique, de ralentir la migration cellulaire et d'induire le phénomène de senescence au sein de nos cellules. De plus nous avons obtenus des résultats prometteurs *in vivo* en réduisant significativement la croissance tumorale de xénogreffes humaines implantées sur des souris NUDE.

L'efficacité de cette molécule est justifiée par son affinité pour une protéine clef dans le processus de carcinogenèse pancréatique, NUPR1 mais peut être améliorée notamment en modifiant sa chimie afin d'augmenter son potentiel anti-tumoral et s'affranchir des effets secondaires tels que la somnolence. Des essais de viabilité sur cellules humaines *in vitro* nous ont permis de sélectionner un analogue de la trifluoprazine, développé par nos collaborateurs, et qu'il est primordial de tester *in vivo*.

Nous souhaitons injecter des cellules tumorales humaines (MIAPaCa2) dans des modèles de souris SWISS NUDE et générer ainsi une xénogreffe soumise à un traitement journalier de manière intrapéritonéale pour garantir l'observance du traitement. Les souris seront légèrement anesthésiées pour faciliter la manipulation et mesurer le poids de l'animal ainsi que la taille de la tumeur tout en diminuant le stress engendré par la piqure.

À terme, les souris seront sacrifiées afin de prélever les tumeurs qui se seront formées durant l'expérimentation.

La règle des 3 R semble respectée puisque

1) nous avons évalué le nombre minimum d'animaux à 40 souris, soit 8 souris pour chaque condition (contrôle 0.1% DMSO) ; 5 mg/kg ; 2.5 mg/kg ; 1 mg/kg et 0.5 mg/kg).

2) nous avons estimé des doses à faible impact neurologiques afin de préserver le bien être des animaux tout en évaluant l'efficacité de notre molécule.

3) nous avons tenté d'utiliser toutes les alternatives possibles (*in vitro*, *in cellulo* et *in silico*) et parmi les options *in vivo* qui nous étaient possible de choisir, nous avons décidé d'utiliser le modèle de Xenogreffes nous assurant un nombre minimum de souris et un risque lié à la douleur quasi inexistant comparativement à des modèles d'OGM développant spontanément un cancer.

11797 Avec plus de 650 millions de personnes touchées dans le monde en 2016, l'obésité est devenue un enjeu de santé publique avec les problèmes sanitaires et économiques qu'elle entraîne. Il est donc déterminant de mieux comprendre comment notre organisme répond à la surcharge calorique pour élaborer de nouveaux traitements.

Lorsque l'alimentation devient plus grasse et plus sucrée, notre organisme met naturellement en place des réponses métaboliques et comportementales adaptées aux apports nutritionnels pour maintenir le poids corporel stable. Mais alors que se passe-t-il pour que le système « déraille » et survienne l'obésité ?

Nous nous intéressons aux perturbations qui apparaissent dans une région du cerveau, l'hypothalamus, qui coordonne normalement des réponses métaboliques et comportementales adaptées à la disponibilité en nutriments. Un régime trop riche en calories est connu pour entraîner très tôt une inflammation des neurones hypothalamiques (appelée neuroinflammation), ce qui perturbe leur activité et qui peut conduire à terme à l'obésité. D'autres cellules cérébrales, les cellules gliales (astrocytes et microglie), qui aident les neurones à fonctionner correctement, semblent participer au développement de cette neuroinflammation hypothalamique. Elles pourraient donc être à l'origine des altérations qui conduisent à l'obésité. Malheureusement, les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène sont encore mal connues, ce qui limite le développement de nouveaux traitements ciblés. Notre laboratoire a montré que la voie de

signalisation cellulaire appelée mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) était activée dans l'hypothalamus médio-basal (MBH) lorsque l'alimentation devenait plus grasse et sucrée.

Dans ce projet, nous voulons comprendre quelles cellules gliales en particulier et quelle(s) signalisation(s) cellulaire(s) (potentiellement mTORC1) sont impliquées dans l'inflammation et les altérations de fonctionnement de l'hypothalamus. Pour cela, nous allons travailler à la fois sur des cultures cellulaires de cellules gliales murines et sur des souris génétiquement modifiées soumises à un régime riche en calories, afin d'étudier la voie de mTORC1 gliale. Nous espérons que ce projet fera la lumière sur les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de la neuroinflammation hypothalamique induite par un régime gras et sucré. Cette étude pourra donc ouvrir des pistes pour le développement de nouveaux outils pharmacologiques pour le traitement de l'obésité.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 1184 souris mâles adultes, car ce projet sera réalisé pendant 5 ans (circa 237 souris/an). Nous avons optimisé les protocoles afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées : des tests de puissance statistique ont été employés pour calculer le plus petit nombre d'animaux par groupe nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. En plus, ce chiffre comprend le nombre d'animaux utilisés pour des études préliminaires (pilotes), afin de déterminer les doses optimales des composés qui seront testés dans nos expériences et mettre en place de nouvelles techniques, ce qui permettra de diminuer la quantité d'animaux utilisés à long terme.

Puisque le but de notre recherche expérimentale est d'étudier des comportements comme la prise alimentaire, ainsi que ses effets sur le poids et la composition corporelle, il est justifiable d'utiliser un modèle animal. Dans la première partie de notre projet, nous utiliserons un modèle *in vitro*, ce qui limitera l'utilisation d'animaux. Suite aux résultats générés *in vitro*, dans un esprit translationnel, il nous sera nécessaire de confirmer les données obtenues avec les cellules et d'observer si elles sont accompagnées des modifications comportementales espérées. D'autres études *in vitro* ne pourraient pas remplacer l'utilisation d'animaux. Toutefois, tous les efforts seront faits pour réduire le nombre et la souffrance des animaux utilisés afin d'éviter les répétitions inutiles.

La souris représente un modèle de choix pour notre projet par la possibilité d'étudier des individus génétiquement modifiés et dont la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'être humain pour que les informations obtenues soient pertinentes sur un plan médical. De plus, les mécanismes biologiques que nous étudions impliquent une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le reste de l'organisme, que ce soit pour la régulation de l'appétit, de la glycémie (taux de sucre dans le sang) ou encore le stockage de graisse. Ainsi, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme entier et aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut le remplacer. Enfin, en vue du raffinement des procédures, un soin particulier est apporté aux questions relatives au bien-être animal. Le suivi précis du poids et de la prise alimentaire de chaque souris nécessite un isolement de l'animal. Ainsi, les souris sont hébergées en cages individuelles dans une pièce dédiée, avec régulation de la température, de l'humidité et de la luminosité. Le manque d'interactions sociales est compensé par un enrichissement des cages. En outre, les cages, transparentes, sont rapprochées les unes des autres afin que chaque animal puisse avoir un contact visuel avec ses congénères. Avant les expériences, les animaux sont manipulés fréquemment afin de les habituer aux expérimentateurs et réduire ainsi leur stress. Enfin, pour les procédures impliquant une neurochirurgie, un protocole d'anesthésie et d'analgésie péri-opératoire est en place afin de garantir la bonne prise en charge de nos animaux.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et françaises, dans le respect des nouveaux standards de soin et de bien-être des animaux, appliqués dans notre équipe de recherche.

11798 L'objectif de la formation est de permettre l'apprentissage de la microchirurgie en condition opératoire avant l'application chez l'homme (lambeaux microanastomosés). Le but étant d'apprendre à des étudiants chirurgiens ou vétérinaires en formation à réaliser des microsutures vasculaires (entre deux bouts d'une artère ou d'une veine) et des microsutures nerveuses (fragments de nerfs sciatiques). L'apprentissage se déroulera sous forme de travaux pratiques (TP). La haute autorité de santé a posé, en 2012, un principe fondamental : « jamais la première fois sur

le patient ». De ce fait, l'utilisation animale reste de nos jours irremplaçables par une méthode substitutive. Toutefois, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés pendant l'année scolaire, la première séance consistera en une vidéo commentée par « surgi trainer » de l'enseignant chirurgien référent qui expliquera notamment les gestes à acquérir pour anastomoser une artère, un nerf ainsi que de montrer les techniques d'asepsie. De plus, les deux premières séances seront réservées à la dissection sur des nouilles japonaises (diamètre d'un vaisseau comparable à celui d'un homme) afin que les étudiants commencent leur apprentissage (maniement du microscope, des micro-instruments). Puis pendant les deux séances suivantes, l'utilisation de pattes de poulet permettra de compléter l'apprentissage sur les modèles inertes (dissection du nerf sciatique). Par la suite, les étudiants débiteront les séances sur l'animal. Le modèle animal sera le rat mâle adulte sprague dawley. En effet, la réalisation d'actes techniques sur le vivant (modèle dynamique) est indispensable à la maîtrise du geste chirurgical (dissection, micro sutures) et du stress opératoire (saignement, difficultés respiratoires) avant le passage à l'homme ; paramètres qui ne peuvent être simulés par « surgi trainer ». Toujours dans un objectif de réduction, lors de chaque séance, l'étudiant se verra attribué un seul animal sur lequel sera réalisé l'anastomose vasculaire et nerveuse. Cette formation se déroulant sur 23 semaines et concernant 14 étudiants, le nombre total d'animaux nécessaire est : $23 \times 14 = 322$ rats par an pour un total de : $322 \times 5 \text{ ans} = 1610$ rats pour les cinq ans. En ce qui concerne le raffinement, toutes les précautions seront prises. Les animaux arriveront la semaine précédente des travaux pratiques. Ainsi, ils seront acclimatés aux locaux et, afin de réduire l'angoisse des animaux un change de litière sera réalisé quatre jours après leur arrivée qui permettra aux rats une habitude à la manipulation. L'hébergement des animaux se fera par groupe de trois (hébergements en groupe sociaux). Un coton de cellulose sera inséré dans la cage des rats pour favoriser l'enrichissement du milieu. Le jour de la séance, chaque animal est placé sous-anesthésie générale par injection de pentobarbital (40mg/Kg) en intrapéritonéal (IP) ainsi qu'une injection de nalbuphine (5mg/kg) en intramusculaire (IM) par la personne référente. Afin de limiter tout stress lié à l'injection, chaque animal sera préalablement sédaté par inhalation d'isoflurane à 5%. Pour simuler le protocole opératoire réalisé chez l'Homme, un rasage de l'animal ainsi que de la Bétadine seront prévus pour limiter les fautes d'asepsie. Dans un but d'assurer le bien-être animal, tout acte chirurgical ne sera réalisé qu'après vérification de l'efficacité de l'anesthésie (pincement de la patte arrière, présence de mouvements involontaires) par la personne compétente. Par la suite, pour garantir l'action de l'analgésie tout au long de la séance, une seconde injection de nalbuphine (5mg/kg) sera réalisée après 1h30 de TP par la personne responsable (les séances dureront 3h). L'anesthésie sera évaluée régulièrement, tout mouvement involontaire entraînera une injection supplémentaire de pentobarbital en IP (0.1mL) par la personne compétente. En fin de séance, la mise à mort de l'animal sera réalisée par surdosage au pentobarbital en IP toujours par l'enseignant référent.

11799 Les macrophages sont des cellules de la réponse immunitaire qui jouent un rôle important contre les pathogènes. Ces fonctions dépendent en fait de leurs états d'activation. Notamment, les macrophages peuvent jouer un rôle anti-inflammatoire, dans ce cas ils sont décrits comme étant de type « M2 », ou jouer un rôle pro-inflammatoire, ils sont décrits dans ce cas « M1 ». Ces états d'activation dépendent de stimuli extérieurs tels que les cytokines ou les facteurs de croissance. Nos données soulignent l'importance des gènes appelés facteurs de transcription (MafB et Fos) dans la régulation des états d'activation des macrophages. Selon la conformation du gène MafB, le macrophage peut changer sa fonction et s'adapter à son microenvironnement. Nous émettons l'hypothèse que le niveau des expressions des complexes de gènes MafB/MafB ou MafB/Fos peut refléter ces possibilités. C'est pour cette raison que nous avons exprimé artificiellement ces complexes dans des macrophages capables de proliférer en culture (macrophages DKO (double déficient pour les facteurs de transcription cMaf/MafB)). Dans ce projet deux approches vont donc être abordées. La première est de voir si l'injection de macrophages exprimant soit MafB/MafB (de type M2) soit MafB/Fos (de type M1) peut modifier le profil inflammatoire induit chez des souris (notamment suite à un choc septique par exemple, injection de LPS). La deuxième est de faire exprimer directement ces complexes dans les macrophages de la souris en utilisant des souris transgéniques et d'enclencher l'inflammation de manière systémique. Différents paramètres seront

contrôlés afin de déterminer si l'expression de ces complexes dans les deux approches impacte le profil inflammatoire des souris (perte de poids, température corporelle, survie, expression de métabolites attestant de dommages tissulaires). Une meilleure compréhension des modèles moléculaires impliqués dans la régulation des états d'activation d'un macrophage et la possibilité de réguler leur activation est une clé pour résoudre plusieurs maladies. En effet, les macrophages sont répartis dans tous les tissus et sont des acteurs importants dans de nombreuses pathologies telles que les maladies inflammatoires ou des cancers. Moduler leur activité en contrôlant l'expression des complexes MafB est une approche intéressante pour des applications thérapeutiques.

La règle des 3R sera respectée dans ce projet :

Remplacement : Dans l'impossibilité d'obtenir des échantillons humains (nécessitant des prélèvements invasifs), l'utilisation de modèles animaux est indispensable. Ne pouvant donc pas remplacer le modèle murin, nous réduisons autant que possible leur utilisation. Ce projet a été évalué positivement par les agences de moyens nationales (ANR, FRM, Inserm) et internationales (HFSP, Helmholtz, EinsteinBIH, ERC) qui le financent.

Réduction : Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux pour chaque groupe, nécessaire à la réalisation d'un test statistique paramétrique, soit un total de souris, mâles et femelles.

Raffinement : Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subie par les souris afin d'obtenir des données qui soient le moins biaisées possible par le "mal être" de l'animal. Une anesthésie générale sera utilisée durant les procédures expérimentales (prélèvement sanguin et transplantation). Nous vérifierons l'état de santé des souris quotidiennement : tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation) sera relevé et évalué grâce à une grille d'évaluation de la douleur. Lorsque les souris présenteront une perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids maximum ou si des signes cliniques apparaissent, les animaux seront mis à mort. Durant l'ensemble de l'étude, les souris seront hébergées dans des conditions conformes à la réglementation européenne en vigueur (environnement contrôlé : température et ventilation régulées, lumière avec un cycle de 12h, hygrométrie), avec un accès continu à la nourriture et à l'eau. Les souris seront maintenues en groupes de 3 à 5 animaux par cage. L'environnement est enrichi par des dômes en carton ou du coton. La surveillance journalière des animaux en expérimentation nous permet de définir un point limite selon les signes extérieurs de souffrance : léthargie, poil hérissé, comportement asocial, dos courbé, animal se déplaçant difficilement, perte de poids supérieure à 20% de son poids initial : L'atteinte d'un de ces points limites entraînera la décision d'euthanasie des animaux concernés. Le nombre de souris utilisées pour ce projet sera de 340 au final pour une durée de 5ans.

11800 Si la consommation d'un bol alimentaire équilibré est indispensable à la santé du fait des composants à effet positif qu'il contient, sont également présents dans l'alimentation des polluants chimiques qui peuvent être à l'origine de dysfonctionnements voire de pathologies liées à l'alimentation. Pour prévenir et/ou limiter les effets négatifs sur le cerveau de l'exposition à ces polluants contenus dans l'alimentation, l'ingestion simultanée d'ingrédients à effet positif, comme des bactéries probiotiques, présents dans un « aliment fonctionnel » pourrait constituer une stratégie permettant de prévenir ce risque. C'est ainsi que les effets cérébraux de certains polluants comme les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) qui se traduisent par une modification du niveau d'anxiété et une neuro-inflammation pourraient être contrebalancés par l'ingestion de probiotiques ayant des propriétés modulatrices de l'anxiété et/ou anti-inflammatoires.

Le projet proposé ici a pour objectif de déterminer s'il est possible de prévenir et/ou limiter les effets négatifs sur l'anxiété et la neuro-inflammation de l'exposition à un mélange de HAP en ingérant de façon simultanée un mélange de bactéries probiotiques. Ce projet inclura 102 souris Swiss femelles, 12 étant utilisée pour une étude survie des bactéries probiotiques dans le tube digestif, 72 pour l'étude des effets neurocomportementaux de l'administration conjointe des HAP et des probiotiques, et 12 pour l'étude du statut immunitaire sous l'effet des probiotiques. Enfin, 6 souris seront utilisées en tant que sentinelle en étant maintenues dans des conditions d'élevage standard de manière à

juger de possibles biais lors du protocole expérimental. La durée totale du protocole est de 49 jours au-delà de la période d'habituation aux conditions d'hébergement et de manipulation qui sera de 10 jours. Les animaux recevront des probiotiques seuls pendant 21 jours puis seront co-exposés aux HAP pendant les 28 jours suivants. Pour l'étude de comportement, 6 groupes expérimentaux seront constitués qui seront exposés aux probiotiques ou aux HAP seuls ou co-exposés aux 2. Les tests de comportement utilisés seront l'open-field, le labyrinthe en croix surélevée, la boîte claire-obscur et le labyrinthe en Y. A l'issue des tests comportementaux, les animaux seront mis à mort selon les recommandations éthiques, le sang et les cerveaux seront prélevés en vue de réaliser des analyses histologiques de l'activité fonctionnelle cérébrale dans différentes régions d'intérêt ainsi que l'exploration de l'état inflammatoire central et périphérique.

Ce travail nécessite le recours à l'animal entier seul mimant la complexité de l'organisme pour l'étude de l'effet de l'administration des probiotiques et des polluants sur le niveau d'anxiété et la neuro-inflammation pour lequel il n'existe pas de méthodes alternatives (Remplacement). Les expérimentations seront effectuées selon les directives réglementaires en vigueur en matière d'hébergement (3 souris par cage de 720 cm², conditions d'hébergement (cycle lumineux, température et hygrométrie) contrôlées, dispositif d'enrichissement dans chaque cage) (Raffinement). Aucun recours à l'anesthésie et l'analgésie n'est prévu, aucune procédure ne nécessitant d'y recourir. Enfin, le nombre d'animaux sera cependant limité au minimum afin de garantir la validité et l'interprétation scientifique des résultats (réduction/raffinement).

Ce projet a été validé par le conseil scientifique du laboratoire et bénéficie de financements régionaux.

11801 La maladie d'Alzheimer (MA) est la forme de démence la plus répandue et devrait toucher plus de 1,3 million de personnes en France d'ici à 2020. Bien que des médicaments aient été mis au point pour atténuer certains des symptômes de la maladie, il n'existe actuellement aucun traitement capable d'arrêter ou de ralentir la progression de la maladie. Une meilleure compréhension des premiers stades du développement de la maladie est essentielle pour faire avancer de nouvelles approches thérapeutiques visant à freiner la progression de la maladie.

La maladie d'Alzheimer est généralement diagnostiquée à la suite de l'apparition de symptômes cliniques tels que la perte de mémoire ou le déclin cognitif. Le diagnostic est confirmé par autopsie avec observation de caractéristiques pathologiques, notamment la formation de plaques composées d'un peptide appelé bêta (β)-amyloïde. Dans les cerveaux en bonne santé, la β -amyloïde est produite à un très faible niveau tout au long de la vie, mais des concentrations plus élevées en β -amyloïde peuvent perturber la communication neuronale et éventuellement conduire à la mort cellulaire. De plus en plus de preuves montrent que l'augmentation de la β -amyloïde se produit à un stade précoce du développement de la maladie d'Alzheimer, avant même l'apparition de symptômes cliniques. Nous étudierons comment une augmentation de l'activité neuronale est causée par les effets β -amyloïdes dans l'hippocampe, une région du cerveau dont l'importance est bien établie dans l'apprentissage et la mémoire et qui est significativement affectée par la maladie d'Alzheimer. Nous étudierons ensuite l'influence des récepteurs nicotiques, une famille de récepteurs connue pour interagir avec la β -amyloïde, sur la pathologie en développement. Cette étude nous donnera un aperçu des mécanismes sous-jacents aux changements dans la fonction cérébrale liés à la maladie d'Alzheimer, nécessaires à une intervention préventive. Nous allons utiliser des souris adultes pour modéliser l'état pathologique. L'utilisation d'un modèle animal est nécessaire pour cette étude car les circuits complexes et les interactions de l'hippocampe chez les mammifères ne peuvent pas encore être reproduits par des cultures ou *in silico*. L'utilisation de souris nous permettra d'étudier les changements de fonction de circuits cérébraux spécifiques avec un degré de détail élevé, à l'aide d'une technologie de pointe irréalisable chez l'homme. Le modèle de souris nous permettra également de tester le potentiel thérapeutique des manipulations pharmacologiques et génétiques pour aider à la conception de futurs médicaments. Nous allons utiliser 390 souris sur une durée de 5 ans. Ce projet comporte 3 procédures de sévérité modérée. Une intervention chirurgicale sera utilisée pour induire la pathologie d'Alzheimer dans l'hippocampe. Une seconde intervention chirurgicale sera réalisée pour permettre la visualisation des circuits

affectés. Même si les interventions chirurgicales ne doivent pas causer des dommages durables chez les souris, une surveillance étroite des souris permettra de détecter au plus tôt tout signe de douleur. Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie, et des analgésiques seront utilisés pendant et après toutes les interventions chirurgicales pour minimiser l'inconfort. Les souris bénéficieront de conditions d'hébergement adaptées et d'un enrichissement de l'environnement (ex. litière supplémentaire et igloos en carton). Le nombre d'animaux utilisés est basé sur notre expérience avec des expériences similaires et est soumis à des tests statistiques chaque fois que possible afin de garantir que le nombre minimum d'animaux est utilisé pour obtenir des résultats informatifs fiables. La conception des expériences et le nombre d'animaux utilisés ont été examinés et approuvés par un statisticien.

11802 L'Interféron gamma (IFN γ) est une cytokine (hormone immunitaire) essentielle à l'immunité contre les virus et les bactéries intracellulaires. La souche probiotique *Lactobacillus bulgaricus* 1073R-1 exprime un haut niveau d'exopolysaccharides (EPS) capable d'induire l'expression d'IFN γ par les cellules de la rate. De plus, les souris nourries à l'EPS montrent une résistance accrue à l'infection par le virus de la grippe, ainsi que des titres élevés d'anticorps contre le virus. L'EPS, ainsi que la bactérie qui le produit, sont donc d'intérêt pour l'industrie du probiotique et leur impact sur la santé et la résistance à l'infection. Nous avons déjà collaboré à des travaux visant à cartographier l'effet immunitaire des EPS *in vivo*, ainsi que les mécanismes impliqués dans son activité. Ainsi, nous avons déterminé que l'EPS agit grâce à la reconnaissance par le récepteur inné NOD2, mais nous ignorons comment l'EPS est reconnu par NOD2, et comment NOD2 induit les effets immunitaires que nous observons. Le but de ce projet est donc d'identifier les cellules immunitaires qui reconnaissent l'EPS *in vivo*, les réseaux qui sont activés par cette reconnaissance, et les mécanismes qui mènent à l'expression de cytokines effectrices comme l'IFN γ . Finalement, nous mesurerons l'efficacité anti-infectieuse de l'EPS dans des modèles appropriés.

Trois procédures expérimentales sont proposées dans le but d'accomplir ces objectifs. Plusieurs expériences visant à comprendre comment l'EPS est reconnu par NOD2, et les voies d'activation cellulaire qui sont induites suite à cette reconnaissance sont déjà menées *in vitro* sur des modèles cellulaires. Néanmoins, la complexité de la régulation immunitaire et la diversité des cellules impliquées nous obligent à vérifier les hypothèses développées *in vitro* dans le modèle de souris. Ce modèle nous permet en outre de mesurer les effets de l'EPS sur l'homéostasie de l'organisme dans son entier, ainsi que sa résistance à l'infection virale. Le nombre de souris utilisées, estimé à 1036, est limité au strict nécessaire afin de satisfaire aux limitations statistiques et de dépasser la variabilité naturelle des réponses *in vivo*. Le degré de sévérité des procédures expérimentales dans lesquelles les animaux sont inclus est soit léger (2 procédures, 736 souris), soit modéré (1 procédure, 300 souris). Le degré de souffrance modéré concerne les expériences impliquant des infections par le virus de la grippe ou par des entérobactéries. Lors de ces expériences, l'état des souris sera surveillé régulièrement par une évaluation de l'état général (prostration, poil hérissé), ainsi qu'une pesée et un contrôle des selles. Si le comportement de la souris est visiblement altéré, si les selles contiennent du sang, ou si la perte de poids excède 20% du poids initial, l'expérience sera interrompue.

11803 L'asphyxie périnatale est responsable d'un quart des quatre millions de décès néonataux dans le monde. C'est aussi une cause importante de séquelles neurologiques. Malgré les avancées des soins intensifs néonataux, le devenir des enfants avec une encéphalopathie néonatale liée à une asphyxie sévère reste mauvais. L'évaluation précoce, la reconnaissance de la sévérité et l'appréciation du pronostic sont des éléments primordiaux pour la prise en charge de ces enfants. Ils permettent de repérer et d'orienter les nouveau-nés pouvant bénéficier d'un traitement par hypothermie, seul traitement neuroprotecteur efficace actuellement. La recherche préclinique sur un modèle animal doit donc impérativement être mise en œuvre afin d'apporter des connaissances sur les conséquences de l'asphyxie chez le très jeune et ainsi améliorer la prise en charge thérapeutique des patients.

L'objectif du projet est donc de mettre au point un nouveau modèle animal d'encéphalopathie associée à une asphyxie périnatale basé sur l'altération globale du débit sanguin cérébral et qui permettrait de pouvoir identifier les déficits fonctionnels engendrés. Nous émettons l'hypothèse qu'un arrêt cardio-respiratoire (ACR) provoqué chez un jeune rat (12 jours post-natal), intubé et ventilé et chez lequel une réanimation est possible, peut constituer un modèle d'encéphalopathie post-anoxie original et proche de la réalité en ce qui concerne les anomalies anatomo-cliniques qui en découlent. En parallèle nous effectuerons des analyses anatomiques afin de déterminer les structures du tissu nerveux atteints lors de l'épisode d'asphyxie soit par imagerie fonctionnelle (IRM) soit par marquage immunohistochimique. Ce projet se déroulera sur 3 ans et nécessitera l'utilisation de 100 rats. Les résultats attendus devraient permettre d'identifier les structures nerveuses qui sont principalement atteintes en cas d'anoxie cérébrale et de prévenir les déficits fonctionnels qui devront alors être ciblés par les traitements thérapeutiques envisagés.

Ce projet a été conçu en conformité avec la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner).
Remplacer : Afin de développer les outils diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques envisagés dans le projet la recherche animale est indispensable, les expériences ne pouvant clairement pas se faire ni chez l'homme, ni sur des modèles cellulaires ou tout autre outil de modélisation. Le choix du rat est objectivé par ses capacités de récupération post-traumatique proche de l'homme.
Réduire : chaque groupe expérimental (contrôle, ayant subi un ACR) sera constitué de 50 animaux, chiffre qui prend en compte les contraintes statistiques et la nature des expériences/analyses réalisées. Chaque expérience sera lancée dans un premier temps sur un nombre restreint d'animaux afin d'évaluer la pertinence de poursuivre la série expérimentale et de raffiner les protocoles. Par ailleurs, dans le souci de réduire au maximum le nombre d'animaux impliqués, certains groupes seront utilisés pour produire plusieurs sources de données (imagerie fonctionnelle et données anatomiques par exemple). De plus nous commencerons à constituer une banque de tissu à partir des animaux utilisés dans ce projet, que nous compléterons par d'autres séries expérimentales éventuellement envisagées dans le futur.
Raffiner : Le laboratoire est doté de l'ensemble des infrastructures (animalerie, salles d'expérimentation, etc.) nécessaires à la réalisation du projet et dispose de l'ensemble des agréments requis et délivrés par les services compétents. Les conditions d'hébergements (nombre d'animaux par cage, renouvellement de la litière, accès *ad libitum* à la boisson et la nourriture, contrôle de la température et de l'éclairage) et d'enrichissement (objets placés dans les cages et renouvelé régulièrement) respectent les normes dictées par les directives européennes. Nous sommes également particulièrement vigilants en ce qui a trait au bien-être animal et la prise en charge de la douleur par le biais de traitements prophylactiques et analgésiques si nécessaire. Des points limites spécifiques de notre étude ainsi que des procédures conservatoires adaptées ont été établies et permettent de garantir le bien-être des animaux.

Les chercheurs participant au projet ont une solide expérience dans la manipulation de rongeurs et l'ensemble des compétences requises à sa réalisation. Il convient de préciser que le projet est bâti en accord avec les recommandations et conseils de la vétérinaire de l'établissement. Ce projet devrait donc permettre d'établir un nouveau modèle animal d'encéphalopathie associée à une asphyxie périnatale nécessaire pour mieux appréhender les cas rencontrés en clinique.

11804 Afin d'améliorer la durabilité de la production aquacole d'espèces carnivores comme les salmonidés, il est essentiel de réduire la part de farine de poisson, issue des pêches minotières, dans les aliments aquacoles. L'augmentation de la part de sucres digestibles dans l'aliment semble être une bonne option tant d'un point de vue économique qu'environnemental. Toutefois, la truite est considérée comme un carnivore strict, utilisant comme principale source d'énergie les protéines alimentaires et faiblement adaptée à l'utilisation des sucres. Les conséquences en sont que lorsque la farine de poisson est substituée à plus de 20% par les sucres digestibles, cette espèce présente des baisses de performance de croissance et une concentration en sucre dans le sang anormalement élevée, définissant cette espèce comme intolérante au glucose. Il a été récemment constaté que ces animaux présentent au niveau de l'ADN de leur foie une modification de certaines marques biochimiques qui sont connues pour réguler, de manière générale, la synthèse de

certaines protéines. La substitution de certains ingrédients d'origine aquacole par des sucres représente un enjeu économique et écologique très important pour la filière truite. En effet, les glucides sont peu coûteux à produire et aisément productibles. De plus les glucides, s'ils sont mieux utilisés par l'animal, peuvent constituer une source d'énergie actuellement apportée par les protéines, et permettre une allocation des protéines uniquement à la croissance et une réduction des rejets azotés dans l'environnement. Il convient donc de comprendre l'origine des modifications de ces marques biochimiques pour par la suite investiguer leurs conséquences et fournir des solutions pour améliorer l'utilisation des sucres par la truite.

Les modifications des marques biochimiques au niveau de l'ADN du foie des truites ont été constatées chez des animaux nourris durant 4 jours après un jeûne de 4 jours avec un aliment contenant des sucres et dont la présence est compensée par une baisse du niveau de protéines. De même ces animaux présentaient une concentration en sucre dans le sang anormalement élevée. Nous souhaitons dans le présent projet déterminer quel est le facteur responsable de la modification de ces marques biochimiques entre la hausse du taux de sucres dans l'aliment, la baisse du taux de protéine dans l'aliment ou encore le niveau de sucre dans le sang en lui-même. Pour cela nous proposons, après 4 jours de jeûne (afin de reproduire les conditions expérimentales dans lesquelles les modifications biochimiques ont été mises en évidence), de nourrir des poissons de 100g (même taille que ceux considérés dans l'étude précédente ayant permis de mettre en évidence ces modifications biochimiques) avec un régime riche en sucre et adéquat en protéines (30% sucres/40% protéines), un régime contrôle (0% de sucres et adéquat en protéines, 40%), et un régime pauvre en protéines sans sucres (0% de sucre et 20% de protéines). Les poissons seront nourris durant 4 jours avec ces régimes (temps de nourrissage appliqué lors l'étude précédente ayant permis de mettre en évidence ces modifications biochimiques et suffisamment courts pour ne pas induire de carences). Concernant l'exploration du rôle de la concentration sanguine en sucre dans le sang anormalement élevée, la seule manière de l'induire indépendamment de l'aliment est d'injecter dans la cavité intra-péritonéale une solution de glucose, pratique courante en expérimentation et n'induisant pas de mal-être. Les poissons recevront donc une injection toutes les 24h durant 4 jours soit de glucose pour maintenir le taux de sucre sanguin élevé, soit de solution contrôle (solution saline) après anesthésie. A l'issue des 4 jours de jeûne 6 poissons seront anesthésiés puis abattus pour être prélevés (sang, foie) (mise à mort par bain anesthésiant de benzocaïne puis bain euthanasiant). A l'issue des 4 jours de traitement (aliment ou injections), 6 poissons seront par traitement anesthésiés puis abattus pour être prélevés (sang, foie) (mise à mort par bain anesthésiant de benzocaïne puis bain euthanasiant). Les poissons non échantillonnés seront donnés à la pisciculture du lycée agricole attenante à nos installations pour l'enseignement.

Le niveau de sucre dans le sang sera mesuré chez chaque poisson prélevé ainsi que le niveau des modifications biochimiques de l'ADN du foie au niveau global mais aussi au niveau de certains gènes candidats déjà connus pour être affecté chez des truites nourries avec un régime riche en sucres. Les mécanismes responsables de ces modifications biochimiques seront aussi analysés.

Remplacement : les effets physiologiques escomptés ne peuvent être observés qu'in situ. Raffinement/réduction : aucun prélèvement ne se fera sur animaux vivants. Les animaux seront anesthésiés avant d'être euthanasiés. Le nombre de poissons prélevés est calculé ad minima compte tenu de la variabilité individuelle observée dans des analyses antérieures et des installations expérimentales dont nous disposons. Dans la présente expérimentation nous mettons 1,5kg (15 truites de 100g) dans des bassins de 80L remplis avec 75L soit une densité de 20kg/m³, densité adéquate permettant de favoriser des comportements alimentaires normaux et non agressifs. Par ailleurs, cette densité reproduit les conditions d'élevage de truite (notamment par rapport à la nutrition), aspect important pour la finalité de notre expérience. Il y aura donc en totalité, 165 poissons dans cette expérience. Les poissons non échantillonnés seront donnés à la pisciculture du lycée agricole attenante à nos installations pour l'enseignement.

11805 Le syndrome de Stormorken se caractérise chez l'Homme par une faiblesse musculaire, une petite taille, un léger retard mental, une absence de la rate, et des problèmes de la peau et de coagulation. Notre équipe a généré le premier modèle murin de cette maladie, afin de mieux comprendre le

développement de la maladie et de proposer des approches thérapeutiques. Il est essentiel d'analyser chaque aspect de la maladie afin de valider le modèle animal, avant de pouvoir l'utiliser. Ainsi, nous partons des symptômes observés chez le patient que nous essayons de retrouver chez la souris. Nous prévoyons donc d'étudier l'anatomie générale de l'animal, sa force musculaire, ses capacités mentales, et aussi le temps de saignement. Les analyses sanguines préliminaires ont montré un déficit en plaquettes. L'ensemble de ces tests seront étalés sur 5 semaines, à la fin du protocole les animaux seront sacrifiés en vue d'analyses histologique. Le phénotype des animaux n'est pas dommageable.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante :

(1) Le nombre d'animaux utilisé sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. Nous prévoyons de faire ces études sur 8 animaux par groupe, soit un total de 32 souris au maximum.

(2) Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie.

(3) Cette approche est effectuée chez la souris, qui est l'espèce de mammifère pour laquelle l'approche génétique est la plus avancée. De plus, l'étude de l'anatomie justifiant les écarts de poids, ne peut pas être réalisé *in vitro*.

11806 Notre projet vise à traiter une bactérie responsable de la plupart des maladies gastriques notamment le cancer de l'estomac : *Helicobacter pylori*.

Le traitement de l'infection à *H. pylori* a connu une escalade ces dernières années passant de 2 à 3 médicaments administrés ensemble.

Bien qu'en terme d'efficacité une éradication puisse être obtenue dans 90% des cas, les effets secondaires de ces traitements sont importants, avec 30-40% de signes cliniquement détectables. Les antibiotiques administrés exercent de plus, une pression de sélection vers la résistance des bactéries exposées hors *H. pylori* et des modifications majeures du microbiote intestinal. Il est donc de grand intérêt de développer des recherches pour trouver de nouveaux composés antibactériens actifs sur cette bactérie.

Dans ce projet nous nous proposons de tester une molécule naturelle nommée Artémisimine encapsulé dans de l'amidon pour le rendre soluble, en parallèle d'un extrait naturel de plante nommé NACINN pour éradiquer *H. pylori* dans un modèle animal de souris infectées par *H. pylori*.

L'efficacité anti-*H. pylori* de ces molécules sera évaluée par rapport au traitement usuel d'éradication de l'infection chez l'homme. Les produits à tester sont non toxiques.

-Artémisimine : L'artémisimine est actuellement largement utilisée dans le monde comme l'un des médicaments les plus utilisés contre le paludisme. Les grandes études cliniques et les méta-analyses n'ont montré aucun effet secondaire grave chez l'homme. Des recherches ont montré que, dans le passé, des thés médicinaux chinois contenant de l'artémisimine naturelle d'origine végétale étaient utilisés pour traiter diverses infections (par exemple des antiparasitaires).

-Amidon : L'amidon alimentaire modifié est déjà approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) en tant qu'additif alimentaire et n'est donc pas toxique. Le glycolate d'amidon est également approuvé en tant qu'excipient (ingrédient inactif) dans les comprimés.

-NACINN : L'extrait de cannelle est déjà approuvé par la FDA comme épice et assaisonnement naturel. Il est largement utilisé dans divers produits alimentaires.

Le principe de cette étude est donc d'infecter des souris par la bactérie *Helicobacter pylori* puis de les traiter par gavage avec le ou les produits susnommés seuls ou en association.

En tenant compte des différents groupes à constituer pour mener à bien ce projet, le nombre total d'animaux prévu est de 180.

La méthode d'infection et de traitement choisie, par gavage, est peu invasive et peu douloureuse pour l'animal.

En matière de raffinement, la souffrance ou la détresse animale sera prise en compte de la naissance jusqu'à leur mort (hébergement adapté et enrichissement dans les cages)

En ce qui concerne la réduction des animaux, nous combinerons les lots témoins.

Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux car malheureusement l'infection par *Helicobacter* est trop complexe pour être entièrement modélisée *in vitro* ou *in silico* car les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans l'inflammation gastrique induite par *H. pylori* sont extrêmement nombreux.

L'infection par *H. pylori* ne provoque aucun effet délétère chez la souris. C'est une maladie non douloureuse qui reste localisée à l'estomac.

11807 Le but de ce projet est de comprendre le rôle des complexes cohésines dans l'organisation fonctionnelle du génome et la régulation de l'expression génique.

Normalement, les chromosomes sont divisés en différents domaines structuraux (appelés TADs) qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de la transcription. En effet, ces domaines correspondent à une compaction locale de l'ADN, permettant à des séquences éloignées d'interagir avec efficacité et spécificité. L'altération de ces domaines, par exemple lors de réarrangements chromosomiques conduit à des dérèglements de l'expression et est cause de nombreuses pathologies génétiques (anomalies du développement, cancers) chez l'homme.

Nous avons déjà montré en inactivant un des co-facteurs nécessaire à son activité, que le complexe cohésine joue un rôle important dans ces processus et particulièrement dans la formation des TADs. Néanmoins, les conséquences sur la transcription des gènes sont encore peu claires.

Afin de déterminer précisément le rôle de la cohésine dans la régulation de l'expression et les interactions entre "enhancers" et promoteurs, nous allons conduire une série d'expériences visant à :

- 1) Déterminer les changements d'activité transcriptionnelle associés à une inactivation de ce complexe ;
- 2) Quantifier l'influence de la cohésine sur la fréquence et la dynamique des interactions entre "enhancers" et promoteurs.

La régulation de l'expression des gènes par des "enhancers" distants n'est que très modérément présente dans des modèles cellulaires, contrastant avec leur importance *in vivo* au cours du développement ou de la différenciation cellulaire. Il est donc essentiel de poursuivre cette étude dans le contexte physiologique (*in vivo*) où ces interactions génomiques sont pleinement fonctionnelles, ce qui nécessite l'utilisation de modèles murins.

Des mutations affectant les différents gènes formant le complexe cohésine sont la cause d'une pathologie complexe, multi-organes, dénommée syndrome de Cornelia de Lange. En étudiant dans ce contexte *in vivo*, chez la souris, les effets moléculaires et physiologiques de perturbations de l'activité des complexes cohésine, nous obtiendrons également des informations particulièrement importantes sur l'étiologie de ce syndrome. Comme chez l'homme, l'haploinsuffisance de ce cofacteur de l'activité du complexe cohésine est létale chez la souris : nous utilisons pour nos études un allèle conditionnel de ce cofacteur (n'entraînant aucune pathologie notable chez l'animal), qui sera supprimé spécifiquement dans le foie (ce qui n'a pas d'impact physiologique majeur)

Ce projet ne comporte qu'une procédure de sévérité légère (n'induit ni douleur ni phénotype dommageable au point de temps étudié). Pour l'étude longitudinale, les animaux seront suivis de manière quotidienne et au moindre signe de détresse, souffrance ou d'inconfort, le protocole expérimental sera amendé et les animaux mis à mort. Afin de limiter le stress des animaux, leur manipulation sera restreinte au strict nécessaire. Le nombre de souris utilisées (126) permettant d'obtenir des résultats probants a été évalué avec l'aide de statisticiens.

11808 La dépression est aujourd'hui la maladie psychiatrique la plus répandue avec une prévalence de 6 à 10% en Europe, mais son traitement reste encore largement insatisfaisant pour une part importante de patients qui ne répondent pas ou peu aux traitements pharmacologiques classiques (antidépresseurs). Elle représente en ce sens un problème majeur de santé publique. En dépit de cette fréquence élevée et du coût économique de sa prise en charge, la compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la dépression et dans la résistance aux traitements antidépresseurs reste encore limitée à ce jour. De nombreuses données, obtenues notamment dans notre laboratoire, montrent que la composante inflammatoire et immunitaire est impliquée dans le développement des symptômes dépressifs ainsi que dans la résistance aux traitements. L'étude de la voie neuro-immunitaire semble donc un candidat de choix pour le développement de nouveaux traitements alternatifs à la pathologie dépressive.

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

Les expérimentations décrites dans ce projet seront conduites dans le plus strict respect des règles et lois éthiques en vigueur. Pour le respect de la règle des 3R, la solidité de nos hypothèses de travail en utilisant des groupes expérimentaux de 12 animaux pour assurer la fiabilité statistique, et la qualité de la mise en oeuvre des procédures, basée sur l'expertise des expérimentateurs, permettront de contrôler au plus juste le nombre d'animaux utilisés. Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux la douleur (anesthésie, utilisation d'antalgique lors des chirurgies) et l'inconfort (manipulation régulière et enrichissement de l'hébergement) des animaux.

Ce projet de 2 ans sera réalisé sur 228 souris males adultes.

11809 • OBJECTIFS DU PROJET

Le glioblastome est un cancer du système nerveux central au pronostic sombre. Son traitement repose sur l'exérèse chirurgicale suivie d'une radio-chimiothérapie, mais la récurrence est souvent inéluctable. La thérapie photodynamique interstitielle (iPDT) est une nouvelle thérapie aux résultats prometteurs (essais en cours chez l'humain) qui consiste à illuminer à une longueur d'onde spécifique via une fibre optique des cellules tumorales préalablement photosensibilisées, afin d'exercer un effet cytotoxique sélectif sur les cellules tumorales malignes. Le suivi thérapeutique se fait généralement par IRM mais cet examen peine à identifier formellement les patients répondeurs et à distinguer radionécrose / persistance tumorale.

Des études précliniques ont déjà montré la faisabilité de la greffe orthotopique de cellules de glioblastome humain chez le rat « nude » et de leur traitement par iPDT. Des illuminations réalisées avec différents fractionnements et à différentes irradiances ont déjà été testées, avec des résultats en faveur d'un schéma avec 5 fractionnements et à basse irradiance. En effet, celui-ci permet une meilleure efficacité histologique et privilégie la mort par apoptose, moins néfaste pour les tissus environnants. Sur le plan de l'évaluation par imagerie, des résultats intéressants sont également déjà publiés ou en cours de publications, montrant notamment que certains paramètres IRM étaient corrélés à la mort cellulaire et donc à la réponse. Cependant on sait les limites de l'IRM pour distinguer précisément radionécrose et persistance tumorale. Tout laisse à penser, et c'est notre

hypothèse, que c'est l'imagerie multimodalité, combinant l'IRM et la tomoscintigraphie à émission de positon à la 18fluoroDOPA (TEP FDOPA), qui serait le plus performant. En effet la TEP FDOPA trace le métabolisme tumoral et apporte des informations complémentaires, notamment concernant la distinction radionécrose / persistance tumorale.

L'objectif de cette étude préclinique est d'étudier sur un modèle animal de glioblastome l'apport de la TEP F-DOPA par rapport à l'IRM pour le suivi thérapeutique de la iPDT, et notamment son impact pronostique. A quel point les paramètres mesurés sur la TEP peuvent-ils identifier les individus bons ou mauvais répondeurs à cette nouvelle thérapeutique ?

• NOMBRE ET TYPE D'ANIMAUX UTILISES

Cette étude préclinique sera réalisée sur un modèle animal de rat nude Hsd RH-Foxn1 nu xéno greffé en orthotopique. Deux groupes de rats devraient être constitués et nous aimerions obtenir une puissance statistique de 80% associée à un risque de première espèce $\alpha = 5\%$. Aucune étude dans la littérature ne concerne la TEP FDOPA et nous ne disposons donc pas d'information sur la différence minimale ou la variance des paramètres issus de cette modalité d'imagerie.

La difficulté résidera probablement dans la mise en évidence des individus non répondeurs. Dans une étude précédente évaluant l'IRM, 10 rats traités par iPDT permettaient de mettre en évidence 3 individus clairement mauvais répondeurs. De ce fait, pour espérer obtenir plus de 8 individus mauvais répondeurs (8 étant le seuil permettant la réalisation d'un test statistique), il faut traiter environ 30 rats. Nous souhaitons également constituer un groupe contrôle (illumination sans photosensibilisateur), pour s'assurer que les modifications observées sont bien causées par le traitement. Ce groupe sera forcément plus homogène et 15 rats suffiraient. Ce qui ferait un schéma 2 : 1 (2 rats traités pour 1 rat contrôle). Dans une étude réalisée précédemment, sur 39 rats greffés seuls 26 avaient pu être traités par iPDT, la procédure de greffe ayant introduit 30 % de perte. Même si l'expérience acquise par notre équipe limitera ces pertes, il est prudent d'augmenter le nombre de rats d'environ 50 %.

Dans l'idéal, nous souhaiterions aboutir à 30 animaux traités et 15 animaux contrôles, ce qui nous amène à un total de 70 rats (pertes comprises).

• AVANTAGES ET DOMMAGES ESCOMPTES

La procédure de greffe stéréotaxique des cellules tumorales, hormis l'incision de la peau, n'est pas un acte algique, et n'entraîne aucun trauma post opératoire. La iPDT n'est pas un acte algique mais pourrait entraîner un œdème responsable de la mort des animaux. La difficulté réelle de cette procédure est la résistance possible des animaux à l'anesthésie, ce qui nécessite d'augmenter les doses et est susceptible d'entraîner leur mort.

• DEMONSTRATION DE LA CONFORMITE AUX 3Rs

Réduire : le nombre d'animaux employés est déterminé de façon à ne pas excéder une valeur minimale, statistiquement significative, à laquelle s'ajoute une marge d'erreur relative aux procédures mises en oeuvre.

Raffiner : la procédure de greffe, ainsi que le suivi de l'animal sont exécutés de telle sorte que la souffrance soit réduite au minimum (aucun geste inutile, antalgiques). Malgré un hébergement individuel, les rats peuvent communiquer entre eux, un suivi clinique quotidien permet de détecter d'éventuelles complications causées par l'opération ou le traitement, et d'évaluer le comportement de l'animal.

Le risque d'œdème cérébral est contrôlé par l'administration de corticoïdes : 1mg/kg de méthylprednisolone (Solumedrol) juste après le traitement et pendant les trois jours suivants.

Remplacer : il n'existe, à ce jour, aucun substitut synthétique nous permettant de mettre en oeuvre ce type d'étude.

11810 La radiothérapie (RT) est un traitement anticancéreux dont bénéficie plus d'un patient sur deux. L'efficacité de la radiothérapie s'explique par la mort des cellules tumorales qui dépend de la dose. Mais l'efficacité anti tumorale est plus complexe et dépend aussi du système immunitaire de l'hôte. Les progrès en immunologie ont permis de faire régresser complètement et de façon durable des

maladies métastatiques autrefois incurables. La radiothérapie stéréotaxique hypofractionnée permet l'administration de doses dites ablatives et est utilisée pour la prise en charge des tumeurs localisées de petite taille et pour les lésions métastatiques. Elle permet d'appliquer des doses par fraction élevées avec des taux de réponse antitumorale importants.

De plus les combinaisons associant de la radiothérapie et de l'immunothérapie montrent une amélioration de l'efficacité de la radiothérapie et de l'immunothérapie sans majorer les effets indésirables. Lorsqu'on délivre une dose adéquate, une inflammation est générée favorisant ensuite l'infiltration de cellules immunitaires. Une grande partie de l'efficacité de la radiothérapie s'explique par l'action de lymphocytes tueurs, cellules clefs de l'immunité adaptative. La radiothérapie génère également une réponse dite immunosuppressive via l'action et le recrutement de cellules de la réponse immunitaire innée d'origine myéloïde qui peuvent contrebalancer et limiter la réponse adaptative des lymphocytes tueurs. L'efficacité systémique de la radiothérapie varie selon la dose et la dose par séance.

Le système immunitaire joue donc un rôle fondamental dans la progression tumorale ainsi que dans la réponse à la radiothérapie. Ce projet a pour objectif de décrypter *in vivo* le recrutement et le rôle des cellules myéloïdes (monocytes et neutrophiles) dans des tumeurs pulmonaires irradiées en conditions stéréotaxiques chez la souris. Ces tumeurs seront générées chez des souris immunocompétentes sauvages ou transgéniques chez lesquelles le recrutement des cellules myéloïdes est altéré. Les irradiations stéréotaxiques seront réalisées grâce à un système d'irradiation du petit animal permettant des irradiations millimétriques en arc-thérapie. La progression tumorale en réponse aux doses ablatives ainsi que le recrutement/infiltration et le rôle des cellules myéloïdes immunosuppressives seront étudiés. La progression tumorale sera quantifiée par imagerie par bioluminescence. Une caractérisation phénotypique des cellules tumorales, des cellules immunitaires infiltrées et des cellules endothéliales sera réalisée par une combinaison d'approches moléculaires à haut-débit et d'imagerie. Ce projet ouvrira des concepts et des pistes thérapeutiques fondamentales pour l'utilisation optimale des doses ablatives et la réponse anti-tumorale dans ce contexte.

Ce projet reposant en grande partie sur des interactions immunitaires et le système immunitaire requérant la synthèse de cellules, leur maturation, leur transport et leur différenciation puis leur modulation par des facteurs que nous ne maîtrisons pas encore aujourd'hui, aucune technique alternative au modèle animal ne peut remplacer aujourd'hui ce système complexe qu'est l'animal vivant.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet (N=1050 sur 5 ans). Des calculs statistiques sont réalisés en amont et ont été validés par le comité scientifique en charge du suivi de ce projet. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. La limitation de la capacité des souris de satisfaire leurs besoins physiologiques et éthologiques sera limitée au strict minimum en enrichissant leur environnement par du coton ou des nids en carton et en leur permettant de vivre en groupe de 2 à 5 souris. Des mesures seront prises pour mettre fin dans les délais les plus brefs à toute anomalie ou à toute douleur, toute souffrance, toute angoisse ou tout dommage durable constatés qui pourraient être évités en définissant des points limites précis et adaptés. Tous les gestes techniques des procédures expérimentales seront faits sous anesthésie locale ou générale.

11811 La dépression, qui est aujourd'hui la maladie psychiatrique la plus répandue avec une prévalence de 6 à 10% en Europe, représente un problème majeur de santé publique. En dépit de cette fréquence élevée et du coût économique de sa prise en charge, la compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la dépression reste encore limitée à ce jour. En effet, il n'a toujours pas été expliqué l'ensemble des facteurs de risque, la résilience, les mécanismes de résistance aux traitements classiques qui permettraient le développement de traitements alternatifs. De nombreuses données (obtenues notamment dans notre laboratoire) montrent que la composante inflammatoire et immunitaire (notamment via l'augmentation de la synthèse de

molécules pro-inflammatoires) est impliquée dans le développement des symptômes dépressifs ainsi que dans la résistance aux traitements antidépresseurs. L'étude de la voie neuro-immunitaire (interaction entre systèmes immunitaire et nerveux) semble donc un candidat de choix pour le développement de nouveaux traitements alternatifs. Les données cliniques obtenues dans notre laboratoire ont grandement contribué aux connaissances actuelles sur le sujet. Par exemple, nous avons montré que l'immunothérapie par cytokine entraîne une dépression chez environ 50% des patients. Les objectifs de cette étude seront d'évaluer, à l'aide d'un modèle animal adapté, le rôle de l'inflammation dans un contexte aigu (induisant un état de type dépressif chez la souris), ainsi que les mécanismes neurobiologiques et immunologiques impliqués. Plus précisément, nous évaluerons le rôle spécifique de l'enzyme indoléamine 2,3 - dioxygénase (IDO) au niveau cérébral et périphérique dans la résistance aux traitements antidépresseurs dans un contexte d'inflammation aiguë. Pour cela, nous utiliserons un modèle d'inflammation aiguë chez la souris grâce à l'injection d'une molécule pro-inflammatoire, nous permettant ainsi d'obtenir un modèle de "dépression inflammatoire". La complexité des mécanismes biologiques mis en jeu, notamment l'interaction entre le système nerveux central et la périphérie, oblige à utiliser un modèle animal car il n'existe pas à l'heure actuelle de technique de remplacement permettant d'étudier ces interactions (Remplacer).

Dans un premier temps, nous évaluerons le rôle d'IDO au niveau cérébral dans la vulnérabilité ou la résistance à la dépression inflammatoire. Cette procédure nécessitera un total de 60 animaux. Sur ces animaux, nous ferons une caractérisation comportementale (évaluation de l'état dépressif de nos animaux), biochimique (évaluation de l'inflammation cérébrale et périphérique) et neuro-immunologique (rôle d'IDO au niveau cérébral et ses effets sur les populations neuronales et gliales). La majorité de l'IDO activée lors d'un événement inflammatoire se trouve en périphérie, et notamment au niveau intestinal. Nous souhaitons donc évaluer également le rôle d'IDO au niveau de l'intestin, ainsi que ses interactions possibles avec le microbiote intestinal. Nous reproduirons donc la même expérience avec pour objectif le prélèvement et l'étude d'IDO au niveau de l'intestin. Les méthodes de prélèvement du cerveau et de l'intestin étant incompatibles, nous ne pouvons pas grouper les 2 procédures (Réduire). Cette procédure nécessitera également 60 animaux.

Si notre hypothèse est correcte, nous souhaitons ensuite mettre en place un traitement antidépresseur et/ou anti-inflammatoire pour tenter de réverser l'état dépressif de nos animaux inflammés vulnérables en reproduisant les procédures précédentes. Ceci représente un total de 480 souris.

Enfin, si les études du microbiote mettent en lumière des variations qui corréleront avec la résistance à la dépression inflammatoire, nous souhaitons tester un traitement prophylactique à l'aide de(s) probiotique(s) identifié(s) comme bénéfique(s), et évaluer les effets de ce traitement sur la dépression inflammatoire, en reproduisant les expériences précédentes. Cette procédure nécessitera 240 animaux.

En minimisant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et atteindre une signification statistique, nous estimons que 15 (pour les groupes véhicules) à 45 (chez les animaux injectés avec la molécule inflammatoire, pour pouvoir séparer les animaux vulnérables des animaux résistants et avoir une puissance statistique suffisante) animaux par groupe expérimental seront nécessaires pour mener à bien notre projet. Ceci représente un total de 840 souris sur deux ans. Tous les animaux seront sacrifiés à la fin de chaque procédure expérimentale pour prélèvements de tissus et analyses ultérieures. Toutes les procédures de sacrifice et de prélèvements seront réalisées sous anesthésie.

Afin de réduire au maximum la souffrance causée aux animaux, nous avons déterminé avec attention les points limites du projet, nous permettant le cas échéant, d'administrer un traitement de confort aux animaux, voire de les sacrifier si leur état ne s'améliore pas. Des carrés de coton ainsi que des igloos en carton seront placés dans chaque cage, afin d'enrichir leur environnement, réduire leur stress et optimiser leurs conditions d'élevage. Ainsi, nous respectons l'obligation réglementaire des 3 R : Raffiner, Remplacer et Réduire.

L'objectif à long terme de ce projet est de transférer les connaissances acquises chez le rongeur à l'Homme pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à améliorer l'état des patients dépressifs résistants aux traitements actuels.

11812 Les maladies chroniques inflammatoires, telles que le diabète, l'arthrite, la sclérose en plaque, ainsi que les maladies neurodégénératives, sont en constante augmentation dans les pays industrialisés. L'étiologie de ces pathologies reste mal comprise. Nous avons proposé que ces maladies sont la conséquence d'un déséquilibre dans la régulation immunitaire, notamment contrôlée par le microbiote symbiotique. Dans un autre registre, la résistance grandissante aux antibiotiques requiert de nouvelles stratégies pour combattre les maladies infectieuses.

Trois types de réponses immunitaires se développent afin de contrer les infections et les cancers. Les réponses de type 1 perçoivent les perturbations intracellulaires induites par les virus et la transformation tumorale, et répondent par la production d'interférons. Les réponses de type 3, à l'inverse, perçoivent les microbes extracellulaires, comme les bactéries et les champignons, et y répondent par l'induction de la phagocytose. Finalement, les réponses de type 2 combattent les gros parasites, tels que les vers. Néanmoins, chaque type de réponse est associé à une pathologie inflammatoire. Les réponses de type 1 et 3 sont associées aux maladies chroniques et autoimmunes, alors que les réponses de type 2 induisent les maladies allergiques. Fait important, chaque type de réponse inhibe les autres types. Ainsi, les réponses de type 1, antivirales, bloquent les réponses allergiques et les réponses antibactériennes, et le manque de réponses antimicrobiennes favorisent le développement d'allergie. Ce principe de fonctionnement du système immunitaire est appelé « cross-régulation immunitaire (CRI) ». De nombreuses données suggèrent que la CRI peut être manipulée et régulée afin de combattre les maladies inflammatoires, et potentialiser les réponses anti-microbiennes. Ce projet vise précisément à tester la puissance thérapeutique de la CRI contre les maladies inflammatoires et les infections.

Dans ce projet, nous proposons de mesurer les conséquences d'une régulation des réponses de type 1, 2 ou 3 sur l'amplitude des autres réponses, et cela grâce à des souris transgéniques qui permettent de bloquer ces réponses à plusieurs niveaux. Ensuite, nous proposons de tester l'impact d'une telle régulation sur la pathologie inflammatoire et l'infection. Quatre procédures expérimentales sont proposées, qui requièrent l'utilisation de 4860 souris des deux sexes. La complexité des mécanismes de CRI, qui impliquent non seulement le système immunitaire, mais également plusieurs systèmes physiologiques de l'organisme, ne peuvent pas être modélisés et remplacés par des systèmes *in vitro*. Néanmoins, nous limitons le nombre de souris au minimum statistique possible. Nous avons utilisé l'outil statistique G*power afin de déterminer le nombre minimal de souris à utiliser par groupe pour obtenir des résultats significatifs en tenant compte de la variabilité inhérente à l'expérimentation. Le degré de sévérité des procédures expérimentales dans lesquelles les animaux sont inclus est soit léger (2 procédures, 1260 souris), soit modéré (2 procédures, 3600 souris). Le degré de souffrance modéré concerne les expériences sur l'inflammation pathologique et les infections. Lors de ces expériences, l'état des souris sera surveillé chaque jour par une évaluation de l'état général (prostration, poil hérissé), ainsi qu'une pesée et un contrôle des selles. Si le comportement de la souris est visiblement altéré, si les selles contiennent du sang ou si la perte de poids excède 20% du poids initial, l'expérience sera interrompue et les souris souffrantes seront mises à mort.

11813 Le traitement de la douleur reste un sujet d'actualité puisque malgré l'efficacité reconnue de certains analgésiques, ceux-ci ne sont pas efficaces sur tous les types de douleur. Les médicaments existants parviennent à apaiser la douleur que pour moins de la moitié des patients et en raison de leurs effets secondaires ne conviennent pas à tous les patients. D'autre part, des médicaments traitant une pathologie peuvent s'avérer avoir en plus des propriétés analgésiques leur donnant un intérêt supplémentaire, d'où leur évaluation dans des modèles de douleur.

L'objectif de ce projet est d'utiliser différents modèles de douleur inflammatoire aiguë (1 journée maximum) ou subaiguë (14 jours maximum) chez le rongeur afin de différencier les composés à tester et d'identifier de nouveaux traitements (préventif ou curatif). Ces modèles induisent des

phénomènes d'hyperalgésies (douleur anormalement amplifiée suscitée par un stimulus douloureux) et d'allodynie (douleur anormalement amplifiée suscitée par un stimulus non douloureux) quantifiables chez le rongeur par des tests comportementaux largement décrits et calibrés, avec des composés de référence permettant de valider l'étude et de réduire le nombre d'animaux nécessaires à la mise au point.

L'intérêt d'étudier le rat et la souris est qu'il existe une différence de récepteurs à certains composés entre ces deux espèces.

La douleur est un ressenti qui ne peut être évalué sur des modèles *in vitro*, la modélisation chez l'animal est donc incontournable.

Le recours à l'animal permet d'étudier dans sa globalité les conséquences cliniques de la douleur, par l'évaluation de différentes fonctions (sensorielles et motrices par exemple) et l'identification de biomarqueurs circulants et tissulaires qui pourront être utilisés en médecine humaine. Grâce à cette approche, plusieurs paramètres sont étudiés sur le même animal fournissant des résultats plus robustes en utilisant moins d'animaux.

Les molécules testées proviennent du service *in vitro* (tests sur des cellules) et ont démontrées un intérêt.

Pour leur bien-être, les rongeurs, qui sont des animaux sociables, seront hébergés en groupe avec un enrichissement dans leurs cages (matériel permettant aux animaux d'exercer leurs instincts naturels, tel que des bâtons pour le rongement, des tunnels pour se cacher ou du coton pour nidifier). Ils seront observés, pesés tout au long des études afin d'écarter tout animal atteignant les points limites définis pour décider de sa mise à mort.

Quand la procédure le permet, les injections d'agent pro-inflammatoire ou irritant induisant la douleur, seront réalisées sous anesthésie générale.

Les procédures décrites induisent une douleur modérée à durée limitée dans le temps.

Un support en biostatistiques par des experts est apporté au chercheur afin d'optimiser les méthodes expérimentales.

Enfin, les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal et à l'observation des signes cliniques fondamentaux.

Une estimation de 5400 souris et de 5400 rats est proposée sur les 5 ans de validité du projet.

11814 Le carcinome rhinopharyngé (NPC pour Nasopharyngeal Carcinoma) est un cancer de la cavité rétronasale qui s'observe principalement dans deux groupes de population : 1) les grands enfants et les adolescents entre 10 et 20 ans et 2) les adultes de la cinquantaine. Il s'agit d'une tumeur agressive susceptible d'envahir la boîte crânienne à travers les os de la base du crâne ou encore de donner des métastases à distance dans les os, le poumon et le foie. Le développement des NPC est en partie liée à un virus appelé virus d'Epstein-Barr présent chez la plupart des individus de l'espèce humaine heureusement presque toujours sans aucune conséquence pour la santé. Malheureusement il arrive que ce virus participe au développement des NPC ; les cellules malignes contiennent l'ADN virales et certains gènes du virus codent des produits qui induisent un comportement aberrant de la cellule, en termes scientifiques, on parle d'un phénotype tumoral. La plupart des NPC sont radiosensibles et chimiosensibles et la guérison est obtenue dans environ 80 % des cas. Toutefois cette guérison a souvent un prix élevé pour le patient avec des séquelles non négligeables, en particulier une insuffisance des glandes salivaires (entraînant une bouche sèche en permanence) et, chez l'enfant et l'adolescent, des anomalies de croissance osseuse en zone irradiée aboutissant à des distorsions du massif facial. D'où l'intérêt de thérapies complémentaires visant non pas à détruire directement les cellules malignes de façon peu sélective mais à les reprogrammer pour les rendre plus vulnérables. Ces thérapies font appel à des agents pharmacologiques qui modifient les régulations épigénétiques, c'est-à-dire que, sans modifier le patrimoine génétique inscrit dans l'ADN des cellules tumorales, ils modifient l'assortiment des gènes actifs dans ces cellules. Pour abrégé, nous appellerons ces agents, „agents épigénétiques“ ou „AEG“. On attend de ces AEG qu'ils activent certains gènes de l'ADN viral dont

le potentiel thérapeutique est important. En effet, ces gènes absents des cellules saines mais contenus dans toutes les cellules malignes ne contribuent pas au phénotype tumoral. En revanche, ils codent des enzymes viraux capables de modifier chimiquement des promédicaments et de les rendre toxiques sélectivement dans les cellules tumorales. Pour tirer parti de ce mécanisme, il faut administrer de façon combinée l'AEG et le promédicament. Cette stratégie thérapeutique a été expérimentée avec succès sur de petits groupes de patients. Toutefois, pour l'utiliser à grande échelle, il faut un degré de certitude supplémentaire qui ne peut être obtenu par les seules expériences *in vitro*. En effet, des études antérieures ont montré que les cellules de NPC les plus représentatives, celles qui sont les plus sensibles aux AEG sont celles pour lesquelles nous ne disposons d'aucun moyen de culture *in vitro*. Ces lignées de NPC sont celles dont la propagation est possible uniquement sur des souris immunodéprimées malgré tous les efforts tentés jusqu'ici pour les propager *in vitro*. On parle de lignées xenogreffées ou PDX („patient-derived xenografts“). Les expériences que nous projetons sur les PDX de NPC sont une étape indispensable avant de pouvoir proposer des traitements combinant AEG et promédicaments. Ceci afin d'avoir le maximum d'assurance d'atteindre une efficacité anti-tumorale au moins équivalente à celle des traitements actuels avec des séquelles en moins. Heureusement pour éviter des mises au point longues et laborieuses et réduire le nombre d'animaux utilisés nous pouvons nous appuyer sur une expérience de plus de dix ans acquises avec plusieurs équipes françaises et étrangères (hollandaises, américaines et chinoises). Cela nous permet d'avoir d'emblée des idées très précises sur les doses et les modes d'administration à utiliser, sans tâtonnements inutiles. La procédure expérimentale comporte quatre étapes douloureuses ou potentiellement douloureuses. Deux d'entre elles seront réalisées sous anesthésie générale (greffe tumorale et prélèvement sanguin). Pour l'administration orale, nous utiliserons des sondes à bulbe pour diminuer le risque de traumatisme. Elles seront baignées dans une solution de glucose avant introduction pour favoriser la coopération de l'animal, avec conditionnement positif. Pour les injections intra-péritonéales, nous utiliserons des aiguilles de très petit calibre et une anesthésie locale (lidocaïne). En dehors de ces étapes, l'inconfort des animaux sera atténué grâce à des dispositifs d'enrichissement placés dans les cages, à une surveillance rapprochée, et à l'application stricte de points d'arrêt expérimentaux (points limite), selon des critères précis et objectifs. A noter que les greffes tumorales seront réalisées de manière à réduire l'inconfort et la douleur suivant un protocole qui permet le maintien de la lésion dans les plans sous-cutanés sans infiltration des organes sous-jacents.

Nous prévoyons la nécessité de 540 souris au maximum pour ce projet.

11815 La grande efficacité des pesticides organophosphorés a entraîné l'essor de leur utilisation dans le domaine agricole, notamment en tant qu'herbicide ou pour lutter contre les nuisibles de type insectes ou vers. La fréquence des intoxications par voie orale ou cutanée est en progression depuis plusieurs années.

La peau, de par sa composition complexe sous forme de strates, est une barrière protectrice pour l'organisme. Cette barrière peut être inapte à réaliser son rôle suivant les propriétés physico-chimiques de certaines substances ou si elle est altérée. Le passage du contaminant dans la circulation systémique va entraîner un syndrome cholinergique se traduisant par une hypersécrétion salivaire et une bronchoconstriction pouvant provoquer la mort. Un traitement symptomatique anti-convulsif et l'administration d'un antidote (atropine) permettent de lutter contre ces effets toxiques. En parallèle pour réduire la quantité de contaminant à la surface de la peau et empêcher sa pénétration de l'argile est appliquée sous forme de poudre : en effet de par son fort pouvoir adsorbant l'argile va séquestrer le contaminant.

L'objectif de ce projet est de potentialiser le pouvoir décontaminant de différentes argiles à l'aide de formulations innovantes pour lutter contre la contamination aux organophosphorés. Pour y parvenir deux formulations, préalablement testées et validées *ex vivo* sur des explants porcins, seront appliquées sur le modèle murin de peau saine après induction d'une contamination organophosphorée. Après avoir déterminé la concentration et la durée d'application de la formulation permettant une décontamination optimale, les formulations seront appliquées sur des modèles murins de peau lésée (excision et brûlure). En effet il n'existe aucun système de

décontamination aux organophosphorés pouvant être appliqué sur une peau lésée, or dans le milieu agricole de nombreux incidents de type coupure ou brûlure sont susceptibles d'avoir lieu. Au cours de ce projet deux argiles différentes par leur composition minérale seront évaluées afin de proposer une formulation de décontamination cutanée aux organophosphorés optimale.

Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de l'essai car il requiert le fonctionnement de l'organisme entier afin d'évaluer au niveau systémique le pouvoir décontaminant des formulations candidates.

Le nombre de souris nécessaires aux expérimentations a été réduit autant que possible sans compromettre l'interprétation statistique des résultats. Une définition précise des points limites, un protocole adapté d'anesthésie-analgésie et une surveillance continue des animaux par un personnel compétent permettront de limiter au maximum toute souffrance animale. Nous prévoyons d'utiliser 610 souris sur une période de 5 ans.

11816 La prématurité est la principale cause de décès et de handicaps chez les nouveau-nés. Dans les pays industrialisés, en raison de l'amélioration des soins intensifs néonataux, le nombre des nourrissons de très faible poids de naissance qui survivent au delà de l'enfance est en hausse. Cependant, le cerveau de ces prématurés reste extrêmement fragile.

La substance blanche du cerveau est le tissu constitué par les axones des neurones. C'est dans ces axones, entourés d'une gaine de protéine appelée myéline, que le signal nerveux circule. Les lésions diffuses de la substance blanche (LSB) constituent la principale forme de lésion cérébrale du prématuré. Les LSB sont majoritairement la conséquence de la présence d'une inflammation, qui peut être induite par différentes causes, par exemple une infection, pendant la fin de la grossesse et dans les jours suivant la naissance (période périnatale). Ce stress inflammatoire périnatal, subi par une grande majorité des enfants prématurés, atteint les cellules cérébrales qui sont encore en développement, et donc particulièrement vulnérables. Les LSB induisent des handicaps moteurs, des déficits cognitifs et des troubles comportementaux qui persistent à l'âge adulte. Malheureusement, aucune thérapie spécifique de ces lésions diffuses n'existe à ce jour. L'amélioration du pronostic de cette pathologie repose donc sur la découverte de nouvelles stratégies neuroprotectrices. Les objectifs de ce projet visent donc (1) à comprendre un des mécanismes impliqués dans l'apparition des LSB : la dysfonction des oligodendrocytes (OLs), cellules productrices de la gaine de myéline permettant la communication rapide entre les cellules nerveuses (2) les effets potentiellement thérapeutiques des cellules souches dans les lésions cérébrales induites par l'IL-1B. Pour cela, nous utiliserons un modèle de LSB induites par des injections d'interleukine 1 beta (IL-1B) chez le souriceau qui reproduit la pathologie humaine de l'enfant prématuré.

Une partie des travaux de ce projet a déjà été réalisée *in vitro* sur des cultures cellulaires. Le remplacement total des analyses *in vivo* par des stratégies *in vitro* n'est cependant pas envisageable actuellement, car les mécanismes impliqués dans les LSB mettent en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires au cours du développement cérébral qu'il est impossible de reproduire en culture. Il est donc indispensable d'associer, aux études *in vitro*, des études chez l'animal soumis à un stress inflammatoire qui reproduit les LSB.

Les expériences de ce projet seront réalisées chez 1007 souris au maximum, sur 5 ans. La bonne reproductibilité et le faible taux de mortalité (5%) du modèle IL-1B permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques (Test de student, Analyse de variance). De plus, en l'absence de résultats concluants pendant la phase de mise au point, le projet sera interrompu.

Ce modèle, qui repose sur des injections intra-péritonéales d'IL-1B, est de sévérité légère et n'entraîne pas de phénotype dommageable chez la souris, qui montre une récupération des fonctions des cellules du cerveau au cours du temps, et un comportement faiblement altéré. Pour l'administration des cellules souches, nous comparerons la voie intra-cérébro-ventriculaire à la voie intra-nasale et choisirons celle qui donnera les meilleurs résultats sur les OLs. L'injection intra-cérébro-ventriculaire sera réalisée sous anesthésie. L'injection intra-nasale est non-invasive et peut

être pratiquée sur animal éveillé. La mise en place de points limites (anémie, déshydratation, absence de prise de poids, lésions) ainsi que l'observation régulière du comportement des animaux permettront d'identifier et de limiter toute souffrance et douleur. En cas de signes d'inconfort, une surveillance renforcée et une analgésie seront mises en place. En cas d'atteinte des points limites, l'animal sera euthanasié.

La procédure 1 (injection intrapéritonéale d'IL-1B (ou de solution contrôle) concernera tous les animaux du projet, du 1er jour de vie jusqu'à la fin des analyses (au plus tard à 8 semaines)

La procédure 2 (administration intranasale des cellules souches) concernera au maximum 962 souris, du 3ème jour de vie jusqu'à la fin des analyses (au plus tard à 8 semaines)

La procédure 3 (administration intra-cérébro-ventriculaire des cellules souches) concernera au maximum 386 souris, du 11ème jour de vie jusqu'à la fin des analyses (au plus tard à 8 semaines)

La procédure 4 (test de reconnaissance d'objets) concernera au maximum 768 souris, du 45ème jour de vie jusqu'à la fin des analyses (au plus tard à 8 semaines).

Les animaux seront euthanasiés en fin de projet pour prélever et analyser les cerveaux.

11817 Le devenir des plaquettes *in vivo* reste un sujet encore débattu. Il s'agit d'un problème central car il intervient dans l'efficacité des transfusions de plaquettes, ou dans les mécanismes pathologiques liés à une diminution du nombre de plaquettes circulantes. En conditions physiologiques, l'élimination des plaquettes vieillissantes a lieu principalement dans la rate alors que dans certaines pathologies, cette élimination pourrait avoir lieu dans le foie. Cette clairance dépend en partie des macrophages, des cellules du système immunitaire qui ont la capacité d'internaliser du matériel extracellulaire. Il existe de nombreuses sous populations de phagocytes distincts par leur localisation, leurs phénotypes et, leurs propriétés fonctionnelles au sein du tissu où elles résident.

Les techniques d'imagerie utilisées jusqu'à présent pour observer l'élimination des plaquettes sanguines reposent principalement sur l'observation de tissus fixés. Nous proposons dans le cadre de ce projet d'observer *in vivo*, en temps réel, l'élimination des plaquettes sanguines dans le foie et dans la rate grâce à l'utilisation d'un microscope bi-photon.

Cette nouvelle technologie permet d'observer des interactions cellulaires en profondeur chez l'animal vivant anesthésié. Ces observations sont complémentaires des études *in vitro* réalisées en amont et permettent d'apporter des éléments supplémentaires à nos connaissances.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des observations suffisamment représentatives. Des tests sur des tissus fixés ont eu lieu dans un premier temps pour mettre au point les conditions expérimentales optimales de visualisation des plaquettes (cinétique, quantité de plaquettes, optimisation des marquages,..) ce qui nous a permis de réduire au minimum le nombre d'animaux requis pour les observations *in vivo*.

Remplacer : Le but de ce projet est d'étudier en temps réel l'élimination des plaquettes sanguines par la rate et/ou le foie. Jusqu'à présent ces tests ont été réalisés sur des tissus fixés ce qui limite l'observation des processus dynamiques entre le sang et ces organes. Cette approche nécessite une approche *in vivo* et ne peut pas être modélisée par des techniques *in vitro*

Raffiner : Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet :

- Hébergement dans des cages munies de particules de bois et enrichie avec un carré en coton compressé afin de permettre aux animaux de réaliser un nid conformément à leurs besoins comportementaux

- Accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture

- Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C afin lutter contre l'hypothermie pendant la chirurgie et pendant toute la durée d'observation sous le microscope.

- Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée de l'opération afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés.

- Injection d'analgésique pendant chaque procédure.

- Mise en place d'une fiche de suivi pour suivre l'état des animaux et veiller à leur bien être tout au long de l'expérimentation.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné

Ce projet nécessitera 280 souris au maximum.

11818 La consommation de charcuterie va provoquer, via sa richesse en fer, la formation de composés toxiques appelés aldéhydes, ce qui est proposé pour expliquer l'effet de la consommation de charcuteries sur le risque cancer du côlon. Des travaux précédents ont permis de montrer que la consommation de fer et nitrites apportés par les charcuteries était responsable de l'augmentation du risque via la formation de composés toxiques pendant la digestion. Ces études ont permis de démontrer que l'effet de ces composés toxiques passait en partie par une modification du microbiote, de l'inflammation et de la perméabilité intestinale. De plus, il est possible de prévenir le risque par la réduction des nitrites ou l'ajout d'antioxydants afin de limiter la formation des composés toxiques pendant la digestion. En collaboration avec des équipes académiques et des industriels, ce projet propose de modifier la production des charcuteries pour proposer des produits charcutiers non associés au risque de cancer colorectal. La partie du projet décrite dans cette saisine vise donc à évaluer l'effet d'un régime riche en charcuteries et de régimes riches en charcuteries peu ou pas nitritées ou enrichies en antioxydants sur la formation des composés toxiques, la perméabilité, le microbiote intestinal, et la promotion de la carcinogenèse colorectale au stade précoce. Nous proposons deux procédures : une première qui est une étude nutritionnelle de 15 jours chez 112 rats mâles F344 conventionnels pour évaluer l'effet sur la formation des composés toxiques, la perméabilité et inflammation intestinale et le microbiote (procédure 1). Les charcuteries modifiées les plus protectrices sur les paramètres suivis dans la procédure 1 seront testées lors de la deuxième procédure, une étude nutritionnelle de 100 jours chez 96 rats mâles F344 pour évaluer l'effet sur la carcinogenèse colorectale (procédure 2) avec un dénombrement post-mortem des lésions précoces dites prénéoplasiques. Pour la procédure 1, 14 groupes (8 rats par groupe) seront constitués afin de suivre les biomarqueurs fécaux et urinaires de l'effet promoteur des charcuteries (formation des composés toxiques), la perméabilité et le microbiote intestinal. Pour la procédure 2, 8 groupes (12 rats par groupe) seront constitués afin de suivre les biomarqueurs fécaux et urinaires de l'effet promoteur des charcuteries (formation des composés toxiques) et le dénombrement des lésions précancéreuses coliques. Cette étude sans prélèvement sur les animaux hors fèces et urines sera conduite dans le cadre de la règle des trois R : le nombre des animaux est réduit au maximum pour toutefois maintenir une puissance statistique suffisante, les conditions de l'étude (suivi de la carcinogenèse au stade prénéoplasique ne provoquant pas de douleur, points limites et critères d'interruption, gavage unique pour suivre la perméabilité intestinale avec sonde à bout arrondi en procédure 1 et injection intrapéritonéale avec un solution préalablement tamponnée dans la procédure 2) limiteront la douleur animale. Les rats seront hébergés 2 par cages dans des locaux d'animalerie conventionnels, avec un enrichissement des cages (nids et tunnels) leur assurant les meilleures conditions de vie et de bien-être. L'utilisation d'un modèle animal est indispensable car nous travaillons au niveau du côlon où le microbiote joue un rôle très important.

11819 Les effets des radionucléides sur l'environnement sont peu documentés. Le tritium est un élément rejeté par les centrales nucléaires dans le cadre de leur fonctionnement normal. Une fois dans l'atmosphère, il peut se retrouver dans les écosystèmes aquatiques. Dans la continuité des travaux déjà réalisés, le but du projet est d'évaluer les potentiels effets toxiques du tritium sur les animaux aquatiques. Le poisson zèbre, *Danio rerio*, modèle très utilisé dans la recherche toxicologique, a été choisi pour cette étude. Les effets du tritium seront évalués sur les stades larvaires, présentant une plus grande sensibilité. Plusieurs réponses physiologiques seront mesurées (immunotoxicité/inflammation, neurotoxicité, détoxification, génotoxicité, malformations, bioaccumulation dans l'organisme). Les réponses obtenues après contamination de larves au tritium seront comparées à celles obtenues après irradiation de larves à une irradiation gamma, de façon à acquérir des éléments de réponse sur l'efficacité biologique relative du tritium.

Ces études nécessitent l'utilisation d'animaux, afin d'évaluer au mieux l'impact sur la fécondité des adultes et la survie des larves. A ce jour, les outils *in vitro* disponibles ne permettent pas une telle évaluation.

Pour réaliser ces expérimentations, 60 femelles et 60 mâles seront utilisés afin de produire les 7605 larves qui seront contaminées jusqu'au stade 10 jours post fécondation. Le respect des règles de remplacement, réduction et de raffinement seront appliquées. Les animaux seront hébergés en groupe dans des portoirs spécifiques qui permettent le suivi des paramètres d'ambiance (température, conductivité, pH). De plus, des observations quotidiennes seront réalisées pour s'assurer du bien-être des animaux. Le nombre d'animaux retenus satisfait les exigences statistiques pour permettre l'obtention de résultats exploitables et publiables.

11820 Les neurocristopathies forment un groupe hétérogène de maladies liées à des anomalies de différenciation, migration, survie cellulaire des cellules provenant des crêtes neurales. Les cellules des crêtes neurales sont issues du tube neural de l'embryon (les futurs cerveau et moelle épinière) et sont à l'origine de nombreux dérivés comme le système nerveux périphérique et les mélanocytes (cellules responsables de la pigmentation de la peau). Les signes cliniques de ces neurocristopathies sont multiples : malformations de la face, retard mental, surdité, malformation des yeux, défauts de pigmentation. Les principales neurocristopathies sont les syndromes de CHARGE, de Treacher Collins, de Waardenburg et de DiGeorge.

Un travail antérieur sur un médiateur cytoplasmique a montré le rôle essentiel pour la formation de la tête des vertébrés. Son absence conduit à des malformations craniofaciales sévères et d'autres manifestations cliniques qui permettent de dresser un tableau très proche des neurocristopathies humaines. Ce médiateur est essentiel à la différenciation et la survie de ces cellules issues des crêtes neurales. De nombreuses publications tendent à montrer que, bien que ces maladies aient des origines génétiques diverses, leur sévérité est fortement modulable par une modification du niveau d'activité d'un gène suppresseur de tumeur majeur. Nous souhaitons tester l'hypothèse suivante : "les caractéristiques cliniques de notre modèle, très proches des neurocristopathies humaines, sont modulables par l'inactivation de ce gène suppresseur de tumeur". Nous renforcerions ainsi notre hypothèse sur le rôle des dysfonctionnements de notre médiateur dans le développement de ce type de pathologie. Nous étudierons aussi les interactions très peu connues entre notre médiateur et ce gène suppresseur de tumeur. Pour cela nous devons maintenir notre modèle murin.

Dans cette étude nous aurons besoin de 160 animaux. Pour réduire au maximum le nombre d'animaux, les combinaisons de croisement sont planifiées pour optimiser l'obtention de souris aux génotypes d'intérêt. Nous raffinerons en cours de protocole en adaptant les croisements en fonction du nombre de femelles obtenues et des combinaisons de gènes. Nous arrêterons le maintien de la lignée dès que les résultats obtenus nous le permettront. La lignée sera cryopréservée afin de pouvoir la revitaliser si nécessaire. Tous les animaux d'intérêt seront utilisés à des fins scientifiques. Afin de vérifier si les combinaisons apparaissent de façon mendélienne ou pas, nous ferons un relevé systématique des génotypes.

11821 CONTEXTE

Les épidémies de fièvres hémorragiques provoquées par le virus Ebola surviennent principalement en Afrique avec un taux de mortalité variant de 25% à 90% selon le type de virus et les conditions de prise en charge.

Le virus Ebola appartient à la famille des Filovirus. Différentes souches ont été identifiées dont les souches Zaïre, Bundibugyo, Soudan, Reston et Côte d'Ivoire. Le virus à l'origine de la flambée de 2014 en Afrique de l'Ouest appartient à la souche Zaïre (appelée également souche Gabon) et a été isolée sous le nom : Ebola Makona.

La flambée d'Ebola de 2014 a nécessité la déclaration de l'état d'urgence internationale par l'OMS et a été responsable de plus de 28000 cas dont 11000 décès. Cette épidémie sans précédent a montré comme particularité de s'être propagée d'un pays à l'autre, partant de la Guinée pour

toucher la Sierra Leone et le Libéria, le Nigéria et le Sénégal. Actuellement la deuxième plus grande épidémie d'Ebola jamais enregistrée sévit à l'est de la République démocratique du Congo, où elle a déjà fait 313 morts.

OBJECTIF

Il n'existe pas encore de vaccin ou prophylaxie homologuée à ce jour. Il est donc urgent de continuer à développer des vaccins pré/post-exposition efficaces. Sur la base de ce qui a déjà été testé précédemment, une première campagne de vaccination en République Démocratique du Congo a été lancée avec un schéma vaccinal utilisant un primo injection d'un candidat vaccin suivi d'un rappel avec un deuxième vaccin. Mais dans l'attente de la vérification de son efficacité, il reste urgent de développer d'autres types de vaccin permettant une protection plus longue dans le temps et avec un schéma vaccinal plus aisé à mettre en place avec notamment une seule injection vaccinale.

TYPE DE PROJET/PROCEDURES/ESPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

Ce projet de recherche de type translationnelle qui s'insère dans un projet global européen renouvelé pour 2 ans pour lequel différentes expérimentations ont déjà eu lieu et dont les données ont été exploitées pour construire ce dernier protocole : il a été précédemment montré l'efficacité de la vaccination en utilisant un vaccin V26 en primo injection puis un vaccin V35 en rappel avec d'excellents résultats (protection de 100% du groupe vacciné et 100% de mortalité dans le groupe contrôle). Il s'agit pour cette dernière étude de montrer l'efficacité du vaccin V35 avec une seule injection. Pour cette étude classée sévère, six macaques cynomolgus seront vaccinés avec le vaccin V35 et 6 autres recevront un placebo Les animaux seront challengés 8 semaines après vaccination avec la souche Makona à 10 ffu en intramusculaire. Sur la base des précédentes expérimentations, l'infection après vaccination ne devrait pas avoir d'effets néfastes sur les animaux vaccinés. Par contre, les animaux contrôles (recevant le placebo à la place du vaccin) devraient présenter des signes cliniques tels qu'une dérégulation de la température corporelle, une perte de poids, une baisse de l'alimentation, de l'hydratation et du tonus ainsi que des symptômes hémorragiques. Les animaux atteignant le point limite au niveau du score clinique ou parvenus au terme de l'expérimentation seront anesthésiés puis euthanasiés afin de procéder à une autopsie avec collecte d'échantillons.

Conformité avec les 3R :

Le nombre d'animaux a été fixé à 12 pour une procédure. Ce nombre a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats interprétables et robustes tout en restant en accord avec les capacités d'hébergement de l'animalerie.

Le macaque est le seul modèle animal sensible à l'infection par la souche sauvage du virus Ebola, la souris n'y est pas sensible. Ces essais sont en amont de l'utilisation du vaccin sur l'homme et c'est donc ce modèle qui se rapproche le plus de la maladie observée sur le terrain et qui permet la meilleure extrapolation possible des résultats.

Une attention particulière sera portée sur l'enrichissement alimentaire, l'enrichissement de confort et sur l'enrichissement de stimulation (altères, anneaux, sachets surprises). Le suivi sera quotidien et les animaux seront observés par un personnel avisé et qualifié. Un examen clinique sera effectué à chaque anesthésie. Un système de vidéosurveillance permettra également de voir le comportement des animaux pendant les périodes où ils ne seront pas stimulés par la présence des techniciens. Le bien-être animal sera suivi à l'aide d'un scoring éprouvé qui reprend les observations du comportement et des symptômes hémorragiques. Afin de confronter les résultats obtenus avec ceux des expérimentations précédentes du même projet européen, les animaux ne seront pas hébergés en volière (même conditions d'hébergement, même fiche de scoring) et cela pour éviter tout biais dans ce dernier protocole.

11822 Si la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancers a beaucoup évolué ces dernières années, la réponse aux traitements reste souvent insuffisante. En effet, de nombreux patients deviennent résistants aux agents utilisés et la réponse, lorsqu'elle est obtenue, n'est

souvent pas définitive, ce qui justifie l'exploration de nouveaux traitements, basés sur de nouvelles cibles.

Nous avons montré que la protéine de survie API5 (Apoptosis Inhibitor 5), dont la fonction précise est mal connue, était impliquée de façon critique dans la résistance des cellules tumorales à l'apoptose (mort cellulaire programmée) spontanée ou induite par les agents de chimiothérapie. Ces résultats suggèrent qu'API5 pourrait constituer une cible pertinente dans l'élaboration de nouvelles stratégies médicamenteuses.

API5 contient un domaine particulier lui permettant d'interagir avec plusieurs protéines régulatrices de l'apoptose. Nous avons synthétisé et optimisé une série de peptides (LZDP) inhibant de ces interactions protéine-protéine et nous avons mis en évidence leur potentiel thérapeutique. En effet, ces peptides induisent l'apoptose des cellules tumorales dans divers modèles *in vitro* (mélanome, cancer du sein, leucémie aiguë promyélocytaire, leucémie chronique de type B) sans effet sur les cellules normales. Ce potentiel anti-tumoral des peptides LZDP a aussi été observé *in vivo* dans des modèles murins de mélanome. L'ensemble de ces résultats font l'objet d'un brevet.

Ces observations nous ont donc incités à explorer le rôle d'API5 et tester les effets des peptides LZDP dans le contexte du syndrome de Sézary (SS), une forme leucémique agressive de lymphome T cutané pour laquelle il n'existe pas de traitement efficace, de la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) et de la leucémie aiguë myéloïde (LAM). Dans ces trois pathologies, la protéine API5 étant fortement exprimée, la stratégie thérapeutique utilisant les peptides LZDP est donc pertinente. A ce jour, 2 peptides ont été testés *ex vivo* et ont démontrés une activité cytotoxique spécifique vis-à-vis des cellules leucémiques du SS, de la LAP et de LAM mais pas vis-à-vis des cellules T ou B non tumorales.

L'ensemble des tests *in vitro* ayant été réalisés, il est indispensable d'utiliser à présent un modèle préclinique permettant de prendre en compte la plupart des caractéristiques et la complexité des cancers (hétérogénéité cellulaire, présence de tissus sains, de barrières qui limitent l'accès du produit à la tumeur).

Nous utiliserons 5 modèles animaux pour reproduire le SS (3 modèles), la LAP (1 modèle) et la LAM (1 modèle). Ceux-ci consistent à injecter par voie intra-veineuse ou sous-cutanée à des souris éveillées immunocompétentes ou immunodéficientes (sans système immunitaire) des cellules leucémiques, ou nécessite une greffe de peau (modèle de SS). Nous utiliserons 3 modèles murins pour le SS, en raison de la complexité de cette pathologie qui se caractérise à la fois par des anomalies de cellules sanguines mais aussi par la présence de cellules cancéreuses au niveau de la peau. Pour cela, nous mettrons en place un modèle consistant à injecter par voie sous-cutanée une lignée tumorale, un autre modèle en injectant des cellules de patients SS par voie intra-veineuse. Enfin, nous souhaitons développer un troisième modèle dans lequel la peau contenant des cellules cancéreuses de SS sera greffée à une autre souris. Ces trois modèles sont complémentaires permettant d'avoir un tableau clinique complet. Dans le cas de la greffe de peau, cet acte sera réalisé sur souris anesthésiées et ayant reçu une analgésie pré- et post-opératoire. Le suivi des animaux se fera sur une période maximale de 11 mois à l'issue de laquelle les souris sont euthanasiées (les expériences de pharmacocinétique et toxicité des peptides dureront entre 1 jour et 1 semaine, les expériences d'efficacité thérapeutique sur les différents modèles de cancer dureront 11 mois au maximum, afin de détecter une éventuelle rechute de la maladie après une phase de rémission).

La prise en compte de la règle des 3R fait partie intégrante de la conception des protocoles expérimentaux de ce projet, de telle sorte que les approches *in vitro* permettront en première instance d'établir une preuve du concept, minimisant le besoin d'études *in vivo*. Nous réduirons ainsi le nombre d'animaux utilisés dans ces études au minimum nécessaire et suffisant pour satisfaire la validité scientifique de l'étude, en particulier au niveau de l'analyse statistique qui nous permet des comparaisons multiples et de limiter le nombre d'animaux. Ce projet nécessitera l'utilisation de 1845 souris, sur 5 ans (111 souris pour l'étude de la toxicité *in vivo* des peptides, 162 souris pour la pharmacocinétique des peptides, 652 pour l'évaluation thérapeutique des peptides dans les 5 modèles précliniques, 500 souris pour l'évaluation thérapeutique combiné

peptide/chimiothérapie classique et 420 souris pour l'évaluation du potentiel thérapeutique des cellules cancéreuses tuées *in vitro* par les peptides).

Une attention toute particulière sera également portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière, quelque soit la procédure expérimentale, qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément à celle des expérimentateurs. Nous veillerons aussi à réduire au minimum (intensité et durée) les souffrances ressenties par les animaux. C'est pourquoi dans toute situation où il est possible que l'animal ressente de la douleur une analgésie préventive sera utilisée, de même qu'après tout geste chirurgical (greffe de peau). Si aucune amélioration n'est observée dans les 48h, la souris sera euthanasiée. La souffrance et/ou douleur sera mise en évidence en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence physique, le poids et le comportement des animaux. Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt qui lorsqu'ils sont atteints conduit à l'euthanasie de la souris.

11823 Le carbone-14 (^{14}C) constitue, avec le tritium (^3H), l'un des deux principaux radionucléides rejetés dans les cours d'eau par les Centrales Nucléaires de Production d'Electricité (CNPE). Ils s'accumulent dans les différents composants de l'écosystème aquatique et contribuent majoritairement à la dose annuelle reçue par la population locale, essentiellement par l'ingestion de poissons marqués. Les modèles de prédiction du transfert du ^{14}C entre l'environnement et les poissons reste simple et nécessite d'être amélioré. En effet, ils n'intègrent pas les différentes formes chimiques du ^{14}C présentes dans l'écosystème et les processus physiologiques modifiant le devenir du carbone le long de la chaîne trophique. De ce manque de connaissances découlent des incertitudes sur les paramètres abiotiques et biotiques régissant le transfert et la distribution du carbone. Le projet a pour objectifs de mieux comprendre le comportement du ^{14}C dans les hydrosystèmes continentaux dans un contexte de rejets des CNPE, et d'étudier le transfert du ^{14}C aux poissons à l'aide d'un modèle apportant davantage de réalisme physiologique dans la description du flux de carbone au sein de la chaîne trophique aquatique. Il s'articule autour de deux axes complémentaires, prenant en compte l'amélioration des modèles de prédiction et l'acquisition de données expérimentales sur le transfert du carbone en conditions contrôlées de laboratoire.

A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'acquérir les paramètres nécessaires aux modèles tels que l'efficacité du transfert du ^{14}C chez les poissons, le taux d'élimination et sa distribution dans les différents organes.

L'utilisation du modèle carpe a déjà fait l'objet d'une demande de projet P18-09. Face aux difficultés actuellement rencontrées pour le modèle carpe, il apparaît nécessaire de mesurer le transfert du carbone sur un autre modèle de poisson, le *Danio rerio*. En effet, cette espèce est adaptée aux conditions d'hébergement des laboratoires et présente un régime alimentaire adapté à nos exigences expérimentales. Ce projet, ici présenté, s'ajoute à celui actuellement mené sur les carpes. 420 *Danio* adultes seront utilisés.

Les animaux seront hébergés en groupe dans des portoirs spécifiques qui permettent le suivi des paramètres d'ambiance (température, conductivité, pH). De plus, des observations quotidiennes seront réalisées pour s'assurer du bien-être des animaux. Le nombre d'animaux retenus satisfait les exigences statistiques pour permettre l'obtention de résultats exploitables et publiables.

11824 Une partie importante de l'enseignement en biologie du développement porte traditionnellement sur des expériences réalisées sur des modèles amphibiens, qui ont permis au 20ème siècle d'établir de nombreux concepts fondamentaux de l'embryologie moderne. Le but de ce protocole est de réaliser une fécondation *in vitro* chez l'amphibien *Xenopus laevis* (aussi appelé crapaud à griffes), en travaux pratiques de niveau master, pour des étudiants se destinant à l'enseignement secondaire et supérieur en Sciences de la Vie. Il leur permettra d'observer les différentes étapes du développement embryonnaire et de réaliser une expérience illustrant les mécanismes de mise en place de la polarité dorso-ventrale. 20 crapauds seront utilisés sur une période de 5 ans, ce qui correspond au minimum nécessaire pour assurer le bon déroulement de ces travaux pratiques. L'utilisation d'animaux est essentielle pour générer les embryons nécessaires aux expériences, la réalisation d'expériences étant beaucoup plus efficace d'un point de vue pédagogique que leur

simple description, y compris à travers des films. Il est également important que des étudiants et futurs enseignants soient formés à la manipulation d'animaux selon les règles de l'éthique animale. Le projet est associé à un degré léger de souffrance animale. Des points limites sont définis, et les animaux sont surveillés quotidiennement.

11825 Chez l'Homme, les cancers de la peau sont en augmentation et constituent un réel problème de santé publique. Le plus répandu est la forme non mélanome qui est souvent due à une exposition prolongée et répétée au soleil.

Actuellement, la thérapie photodynamique (PDT) est une alternative à la chirurgie, la chimiothérapie ou encore la radiothérapie pour traiter ce type de lésions cutanées. Ce traitement a une efficacité à long terme acceptable, très peu d'effets secondaires et a pour avantage de laisser peu ou pas du tout de cicatrices. Il repose sur l'exposition par la lumière d'une zone préalablement traitée avec une crème contenant le principe actif. Une réaction photochimique est ainsi provoquée, induisant la destruction des cellules tumorales.

L'efficacité du traitement actuel pourrait néanmoins être améliorée si le principe actif était mieux délivré dans les couches de la peau. Pour cela, nous proposons de tester un nouveau dispositif qui optimiserait la délivrance transdermique du principe actif à l'aide de patchs dotés de microaiguilles. Elles sont constituées d'un matériau biocompatible et peuvent traverser la première couche de la peau, se biodégrader et libérer le principe actif qu'elles contiennent rapidement et plus profondément dans la peau.

Nous projetons de comparer sur des modèles rongeurs (rats) l'efficacité à détruire les cellules tumorales des patchs de microaiguilles à celle de la crème utilisée dans le traitement actuel.

Le nombre maximum de rats engagés dans ces expériences sera de 96.

Les procédures ont été établies en suivant la règle des « 3R » :

- L'étude de la délivrance du principe actif à travers la peau puis sa métabolisation en un métabolite actif sur les cellules tumorales ne peut pas être faite sur un modèle cellulaire ou par simulation informatique. Elle nécessite un modèle *in vivo*. Le modèle animal ne peut être aujourd'hui remplacé.

- Le nombre de rats a été déterminé afin de le réduire au maximum tout en ne compromettant pas la validité des tests statistiques qui seront réalisés.

- L'état de santé des animaux sera suivi tout au long de l'expérience. Les rats seront anesthésiés lorsque les microaiguilles, d'une longueur inférieure à 800 µm, seront appliquées sur leur peau. Du personnel qualifié surveillera l'état de santé des animaux régulièrement tout au long des expériences, notamment au niveau de la zone cutanée lésée. Cela permettra une intervention immédiate et appropriée dès le moindre signe de souffrance. Les animaux sont hébergés en groupe dans une cage enrichie avec des accessoires de jeu et du matériel pour la fabrication de nids.

11826 L'objectif de ce projet s'inscrit dans l'évaluation d'approches de thérapie génique médiée par des vecteurs viraux pour des maladies génétiques rares du muscle, les dystrophies musculaires, pour lesquelles il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement.

Ces maladies sont caractérisées par un processus dystrophique important qui comprend des cycles de dégénérescence/régénération, une forte inflammation et une perte des fibres musculaires au profit de tissu fibrotique ou adipeux.

Le but de ce projet est d'évaluer l'effet de traitements thérapeutiques agissant sur les différentes composantes du processus dystrophique en combinaison avec un produit de thérapie génique (portant une copie normale du gène déficient) afin d'en évaluer la synergie sur un modèle murin de chacune des pathologies incluses dans le projet. Les résultats obtenus devraient permettre une meilleure efficacité de la thérapie génique et donc une réduction des doses à administrer.

Remplacement : Les études d'efficacité thérapeutique ne peuvent se faire qu'*in vivo*, ce qui ne permet pas de remplacer.

Réduction : Les molécules pharmacologiques utilisées dans ce projet ont été sélectionnés par les différentes possibilités sur des modèles cellulaires afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet.

Raffinement : En plus de la réglementation en vigueur, des mesures supplémentaires seront prises dans les procédures expérimentales (utilisation de plaque thermostatée pour maintenir la température corporelle stable ; de gel oculaire pour éviter le dessèchement des tissus lors des anesthésies...)

Dans ce projet, nous estimons que 643 souris seront utilisées. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études ainsi que sur un calcul de taille d'échantillon permettant une analyse statistique des résultats.

11827 Dans sa pratique quotidienne, le chirurgien maxillo-facial est souvent confronté à la difficile tâche de la reconstruction de l'oreille externe, que ce soit dans le cas d'une perte de substance congénitale (microtie ou anotie) ou après une exérèse carcinologique ou post traumatique.

Trois techniques chirurgicales sont actuellement utilisées : la reconstruction par greffe de côte, la mise en place d'implant synthétique sous la peau ou encore le port d'une prothèse.

Cependant, ces techniques présentent toutes des inconvénients et c'est pour cela que se multiplient des modèles de reconstruction d'oreille développés grâce à l'apport de l'ingénierie tissulaire de cartilage.

Dans ce contexte, nous avons développé une technique de reconstruction du cartilage *in vitro* par ingénierie tissulaire à partir d'un biomatériau (support) composé de cartilage d'oreille de porc auquel nous avons ôté les cellules (cartilage décellularisé). Ce biomatériau permet de garder une matrice extracellulaire issue du tissu que nous souhaitons reconstruire.

En vue de la confection du biomatériau, le cartilage décellularisé est transformé en poudre puis incorporé à un liant, l'alginate, ce qui permet d'obtenir un support malléable, avant d'y inclure de façon homogène les cellules progénitrices.

L'objectif de ce travail est de créer un modèle animal de défaut cartilagineux au niveau de l'oreille de lapin. Ce défaut sera reconstruit dans différentes conditions en s'appuyant sur nos travaux *in vitro* (poudre de cartilage, alginate, mélange des deux, avec ou sans cellules).

Pour cette expérimentation, nous avons choisi le lapin. Cet animal nous paraît être le plus adapté au vue de notre travail sur le cartilage, en effet, les lapins présentent de grandes oreilles.

Cette expérience sera réalisée sur 25 lapins. Nous réaliserons 2 étapes :

- la première étape sur un lapin qui sera le lapin « fournisseur » de cellules progénitrices et
- la deuxième étape sur les 24 autres sur lesquels des défauts de cartilage seront faits et plusieurs conditions pour reconstruire seront testées. Afin d'optimiser au mieux le nombre de lapin, nous réaliserons sur chaque oreille 4 défauts ce qui nous permettra de tester 4 conditions par lapin. Il y aura 2 lots de lapins en fonction de la date de sacrifice : le premier lot de 12 lapins sera sacrifié à 1 mois, le second lot à 2 mois. Après le sacrifice, les greffons seront récupérés et analysés pour évaluer la synthèse de cartilage.

Les expériences seront élaborées dans le respect des règles éthiques. La douleur, la souffrance et l'anxiété seront considérées grâce à un suivi individuel régulier des animaux tout au long de la procédure. Des antalgiques et anesthésiques seront utilisés lorsque nécessaire et des points limites ont été établis.

Concernant le raffinement des conditions expérimentales, l'état de chaque animal sera contrôlé quotidiennement afin de s'assurer de son bien-être. L'animal sera immédiatement soigné s'il présente des blessures légères. En revanche si un animal montrait des signes cliniques de souffrance (perte de poids >20% du poids initial, apathie...), celui-ci serait immédiatement retiré du protocole d'après le point limite décrit pour le projet.

11828 Il est désormais indispensable de déterminer la toxicité éventuelle de produits à utilisation industrielle (ex : gaz) afin d'évaluer le risque encouru par les personnes susceptibles d'y être accidentellement exposées. Seule l'expérimentation animale permet de livrer des informations pertinentes dans les conditions d'exposition potentielle à des gaz industriels.

De plus, afin de respecter le bien-être animal, nous travaillons dans le souci du respect de la règle des 3 R. Une attention particulière est portée afin de réduire le nombre d'animaux utilisés (réalisation d'analyse de composition chimique des produits à tester afin de choisir au mieux les concentrations à tester et ainsi réduire au maximum le nombre de groupe à exposer), de raffiner l'environnement (enrichissement du milieu par des igloos permettant aux animaux de se cacher, les animaux sont gardés en groupe de 5 permettant leur permettant de socialiser avec leurs congénères).

Dans cette étude, nous évaluerons dans un premier temps la tolérance de souris à l'inhalation de gaz destinés à être utilisés dans les appareillages électriques type interrupteur/disjoncteur, potentiellement modifiés par un courant de rupture.

Afin de tester la toxicité de gaz ou mélanges de gaz, des souris seront exposées pendant 4 heures à différentes concentrations des gaz à tester. Les animaux seront suivis pendant 14 jours après l'exposition pour détecter une intolérance éventuelle, un examen clinique quotidien sera réalisé afin d'évaluer la douleur et la souffrance des animaux et regarder si on ne dépasse pas les points limites. A l'issue des 2 semaines, les souris seront euthanasiées afin d'effectuer un examen macroscopique des poumons, du foie et des reins et un bilan sanguin sera réalisé.

Cette procédure couvre l'utilisation d'au maximum 1500 souris pour 5 ans.

Dans un second temps, nous évaluerons la génotoxicité de ces gaz, pour cela des souris seront exposées pendant 4 heures à 3 concentrations des gaz à tester. La concentration la plus élevée est définie comme la dose maximale tolérée (DMT), c'est à dire la dose la plus élevée qui sera tolérée sans faire apparaître de signe clinique de toxicité important (ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse). Les animaux seront euthanasiés 24 heures ou 48 heures après l'exposition. La moelle osseuse sera prélevée afin de vérifier s'il y a des signes de génotoxicité.

Cette procédure couvre l'utilisation d'au maximum 400 souris pour 5 ans.

Dans ces deux procédures, les groupes seront composés de 5 animaux afin d'avoir un échantillonnage suffisant pour :

- déterminer un pourcentage de mortalité pour chaque concentration testée (détermination de la Dose létale 50)
- réaliser des statistiques (résultats des analyses sanguines et génotoxicité)
- suivre les protocoles demandés par les industriels pour qui nous réalisons cette étude

Les 2 procédures couvrent au total l'utilisation d'au maximum 1900 souris pour 5 ans.

11829 Suite à une infection ou une vaccination, notre système immunitaire monte une réponse impliquant différentes cellules et molécules qui combattent l'infection et nous protègent contre une future exposition.

Les lymphocytes B jouent un rôle central dans cette réponse en reconnaissant de façon spécifique les agents infectieux et en produisant des anticorps qui vont se fixer à ces agents infectieux et ainsi favoriser leur neutralisation et leur élimination.

Nous travaillons sur une molécule qui contrôle la réponse immune au niveau des lymphocytes B en favorisant la production d'anticorps. Nous avons obtenu un modèle de souris génétiquement modifié, n'ayant pas de phénotype dommageable, dans lequel cette molécule peut être éliminée uniquement dans les lymphocytes B.

Afin de comprendre comment cette molécule agit sur la qualité de la réponse immune et comment cela pourrait impacter l'efficacité de la vaccination nous allons étudier la réponse vaccinale dans ce modèle animal. Pour cela à différents temps après l'injection intrapéritonéale de molécules immunogènes à des souris transgéniques, nous étudierons les proportions de chaque population lymphocytaire. Les souris utilisées dans ce projet proviendront d'un élevage entretenu et maintenu

localement. Au total ce projet nécessite l'utilisation de 360 souris tous génotypes confondus sur une période de 5 ans.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, nous appliquerons la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). Tout d'abord, les réponses immunitaires dépendant de l'environnement complexe des organes lymphoïdes, il est impossible de remplacer totalement le modèle animal. Nous nous efforçons de réduire au maximum le nombre (360 souris sur 5 ans) d'animaux utilisés pour ce projet tout en restant dans une proportion suffisante pour avoir des résultats statistiques sûrs et précis.

Nous veillerons au bien être animal en élaborant des méthodes permettant de réduire, supprimer, soulager l'angoisse et la détresse subit par les animaux, notamment en enrichissant les cages avec des rouleaux en cartons. Les procédures les plus longues s'étendent sur 2 mois, durant lesquels la souris vigiles subira au maximum une injection intrapéritonéale et des prélèvements de sang. Un suivi journalier sera effectué pour chaque souris, et des fiches de bien être animal seront établies faisant état des points limites à surveiller. A l'issue de chaque procédure les animaux seront euthanasiés.

11830 Les effets des radionucléides sur les écosystèmes sont peu documentés. Ils concernent des données issues d'études de terrain et de laboratoire, qui dans certains cas peuvent être divergentes. L'étude multigénérationnelle en milieu contrôlé semble une voie à privilégier pour améliorer la comparaison des effets observés sur le terrain et ceux obtenus au laboratoire.

Notre axe principal de recherche a pour objectif d'étudier en conditions contrôlées de laboratoire les effets multigénérationnels de l'exposition aux rayonnements ionisants, le rayonnement gamma en particulier. Il complète les approches actuellement menées sur les stades précoces et adultes du poisson zèbre, *Danio rerio*. Cet axe nécessite la mise en place de l'élevage de *Danio rerio*. L'élevage de *Danio* est régulièrement mis en place dans les laboratoires de recherche et dans les établissements « éleveur ». Toutefois, le projet, ici présenté prévoit d'adapter les conditions optimales d'alimentation des stades précoces aux exigences de nos conditions d'exposition. En effet, le protocole d'alimentation à développer devra réduire au minimum le temps d'intervention des personnels afin de garantir constantes les conditions d'irradiation gamma de notre installation. Ce projet sera réalisé sans irradiation. Une partie des *Danio* générés au cours de ce projet sera utilisé dans le cadre des différentes activités du laboratoire.

A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'acquérir des données d'effets après exposition multigénérationnelle. Il est nécessaire d'utiliser une espèce de poisson, ici l'espèce *Danio rerio*, régulièrement utilisée en écotoxicologie et dans notre unité. Les points limites, connus pour cette espèce concernent le suivi du comportement de nage et d'alimentation.

Ce projet conduira à l'utilisation de 60 *Danio* adultes matures. Au maximum, 2220 *Danio* adultes seront élevés au cours de ce projet. Soit 2280 animaux.

Deux procédures expérimentales sont présentées. La première concerne la mise en place d'un élevage de *Danio*. La seconde concerne l'élevage de *Danio* pour alimenter les différents projets de recherche du laboratoire.

11831 Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune caractérisée par la production d'auto-anticorps (anticorps dirigés contre l'organisme), associée à une inflammation qui peut toucher différents organes. Les traitements actuels (immunosuppresseurs, anti-inflammatoires) sont source de nombreux effets indésirables et ne permettent pas de guérir du lupus. L'objet de nos études est de comprendre les mécanismes aboutissant au développement de cette maladie et de développer des thérapies permettant de cibler certaines des atteintes les plus graves (comme l'atteinte rénale). Nous nous intéressons particulièrement à la réponse immunitaire anormale observée au cours du lupus et nous avons identifié des cellules potentiellement impliquées dans le développement de la maladie. Il a été montré que l'administration unique d'une huile hydrocarbonée, le pristane, chez des souris saines induit le développement de certains symptômes de la maladie lupique. Ce modèle murin de lupus induit permet donc de maîtriser le

temps de développement de la maladie et le nombre d'animaux injectés en fonction des besoins de l'étude. Les animaux seront injectés une fois avec l'huile hydrocarbonnée puis observés de façon régulière afin d'étudier les différents stades de la maladie. Les résultats que nous obtiendrons grâce à ce modèle murin de lupus induit nous permettront de poursuivre la caractérisation des mécanismes pathologiques auto-immuns afin, à terme, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le but de développer de futurs traitements plus spécifiques.

Pour réaliser ce projet nous utiliserons un total de 864 souris saines (BALB/c et C57BL/6). Ce nombre total a été calculé de façon à respecter au mieux la règle de réduction des 3R. En effet, pour compenser l'hétérogénéité inhérente aux animaux et pour caractériser des populations cellulaires rares dans les organes lymphoïdes, nous avons besoin d'un nombre élevé de souris pour chaque expérience. Pour répondre à la question du raffinement, les souris seront hébergées par groupes et les cages seront enrichies avec l'ajout de "nids". De plus, elles seront anesthésiées avant chaque prélèvement sanguin. Les souris seront manipulées par des personnes compétentes et formées à l'expérimentation animale. Enfin, les souris seront observées quotidiennement, afin d'évaluer tout signe de douleur et en respectant les points limites affichés dans notre animalerie. Nous ne pouvons pas, ici, assurer la règle du remplacement. En effet, les études ne peuvent en aucun cas être réalisées *in vitro* car il s'agit d'une maladie auto-immune systémique chez l'animal comme chez l'Homme, les études nécessitent donc l'animal entier.

11832 La prévalence mondiale de l'obésité ne cesse d'augmenter. Aujourd'hui plus d'un milliard d'adultes sont en surcharge pondérale et au moins 300 millions de personnes sont obèses. L'obésité abdominale favorise le développement du syndrome métabolique et est souvent associée à une résistance à l'insuline. L'obésité est caractérisée par une hypoxie et une inflammation sous-jacente du tissu adipeux avec une augmentation de la production de molécules pro-inflammatoires. Cet environnement pro-inflammatoire altère la voie de signalisation de l'insuline dans les tissus périphériques, notamment les muscles. REDD1/DDIT4 est une protéine impliquée dans différentes voies de stress cellulaire comme l'inflammation et l'hypoxie. Les résultats préliminaires *in vitro* ont montré que l'expression de REDD1/DDIT4 est corrélée avec l'activation des voies de signalisation proinflammatoires qui sont impliquées dans le développement de la résistance à l'insuline. L'utilisation de souris invalidées pour le gène codant la protéine REDD1/DDIT4 (lignée Ddit4tm1Fein que nous appellerons REDD1^{-/-}) permettra de déterminer l'implication de cette protéine dans le développement de la résistance à l'insuline au niveau systémique. Ce projet d'expérimentation animale fait suite à un premier projet dans lequel la souche a été purifiée sur un fond C57BL6/J et le phénotype des souris REDD1^{-/-} caractérisé. Il a été mis en évidence des différences de sensibilité à l'insuline entre les lignées sauvages et les lignées REDD1^{-/-} soumises à un régime normal ou riche en graisse mais il est nécessaire de poursuivre ses travaux de recherche. Une caractérisation du phénotype des souris REDD1^{-/-} dans des conditions standards ou dans le contexte d'un régime riche en graisse (prise alimentaire, poids, métabolisme de base par calorimétrie indirecte, observation du développement de la résistance à l'insuline) est envisagé dans le cadre d'un projet déjà déposé.

Pour satisfaire au remplacement, il a été réalisé des études préliminaires sur cellules adipocytaires cultivées *in vitro* qui ont montré le rôle de Redd1 dans le développement de la résistance à l'insuline lors de l'hypoxie.

Afin d'obtenir des informations sur le rôle de cette protéine chez l'Homme, comme il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de tenir compte de toute la complexité et de toutes les interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme, le recours à un modèle animal apparaît comme la meilleure alternative pour étudier la fonction de la protéine Redd1. Le modèle, déjà disponible, de souris invalidées pour le gène codant la protéine Redd1 a donc été choisi. L'objectif du projet initial est de comprendre le rôle de Redd1 dans le développement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité. Ce projet pourrait mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Dans ce contexte, notre intervention aura pour objectifs, de mettre en place des stratégies permettant de garantir la pérennité de la lignée REDD1^{-/-} (cryoconservation par le sperme) et de

garantir un statut sanitaire sain (SPF) pour ces animaux (décontamination par transfert d'embryons issus d'un croisement REDD1-/- x REDD1-/-).

En cas de retard sur l'avancée du projet, la lignée pourra éventuellement être hébergée au sein de notre structure agréée et nécessiter la génération d'animaux REDD1-/- dont le phénotype a été décrit comme dommageable précédemment. En effet, il a été rapporté pour ce modèle, que lorsque des accouplements REDD1-/- x REDD1-/- sont réalisés, 55% des géniteurs n'engendrent aucun sevrage (souris non gestantes, souriceaux morts nés ou morts à quelques heures de vie tous confondus) contre 20% habituellement chez les animaux wild types de même fond génétique (C57BL6J).

Un des objectifs de notre action est de satisfaire la règle des 3R dans le cadre desquelles s'inscrivent les procédures de cryoconservation et de décontamination par transfert d'embryons. En effet, la cryoconservation est une technique qui permet non seulement de réduire l'utilisation d'animaux vivants dans les échanges de modèles entre instituts ou centres de recherche mais aussi de sécuriser ceux-ci sur la maîtrise des conditions sanitaires lors des échanges. De plus, la technique de transfert d'embryons permet l'acquisition d'un statut sanitaire de haut niveau, mais aussi de réduire de façon conséquente la part d'animaux utilisés lors de la phase d'élevage des animaux utilisés en expérimentation. D'un point de vue pratique, le bien-être des animaux sera respecté tout au long du projet, répondant ainsi au besoin de raffinement décrit dans la règle des 3Rs. Les transferts d'embryons sont réalisés sous anesthésie générale suivie d'une surveillance renforcée des animaux. Cette procédure est appliquée sur l'ensemble de nos projets. Cette technique est aujourd'hui une des bases de la maîtrise du nombre d'animaux utilisés lors de la phase de production des lots destinés à l'expérimentation.

Dans le cadre de ce projet, et pour satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique des cages, et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Enfin, bien qu'aucune souffrance particulière des animaux ne soit attendue, nos surveillances régulières nous permettront d'identifier d'éventuelles souris souffrantes et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue mise à mort dans les cas les plus graves).

Pour ce projet, un nombre de 20 souris (tous génotypes inclus) sera généré en cas de revitalisation de la lignée seule. Ce nombre pourra être relevé en cas de maintien de la lignée dans notre structure à cause d'un retard dans la réouverture de la structure d'accueil. Dans ce cas, nous générerons les animaux nécessaires à la réalisation de la totalité du projet (dans la limite de 1000 souris produites pendant une durée de 2 ans). La règle de la réduction sera appliquée en produisant uniquement le nombre d'animaux requis pour les expériences.

11833 Le développement de nouvelles sondes d'imagerie, que ce soit pour la détection de tumeur ou pour la thérapie, passe par la conception de nanoparticules élaborées par des chimistes. Dans le cadre des collaborations que notre équipe a établi avec plusieurs partenaires chimistes, nous sommes amenés à tester les nanoparticules en imagerie *in vivo*. Avant d'être injectées à l'animal, l'absence de toxicité des nanoparticules sera vérifiée par nos partenaires. L'objectif est d'étudier le comportement de ces nanoparticules une fois injectées à l'animal. Nous utiliserons des lignées cancéreuses génétiquement modifiées qui seront injectées aux souris, sans présenter de phénotype dommageable, pour générer des tumeurs sous cutanées. La bio distribution des nanoparticules dans l'organisme s'effectuera par imagerie optique qui est une méthode non invasive permettant ainsi de réaliser un suivi dans le temps sur un même animal.

La demande des chimistes étant de plus en plus importante, nous prévoyons de tester une dizaine de nanoparticules par an, à raison de 6 souris par lots, soit 60 souris par an. Le projet étant sur 5 ans, soit un total de 300 souris.

L'utilisation des animaux est indispensable pour reproduire les mécanismes complexes liés aux tumeurs et il n'y a pas d'autres alternatives pour étudier la bio distribution d'une molécule. Les nanoparticules synthétisées par les chimistes seront d'abord testées *in vitro* pour s'assurer de leur

non toxicité. Seules les nanoparticules ayant un réel intérêt seront testées chez l'animal. L'utilisation de l'imagerie optique permet de réaliser un suivi dans le temps sur un même animal, ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés au final. Les fratries ne sont pas séparés et un enrichissement du milieu est fourni par l'animalerie. Toutes les procédures sont réalisées sur animal anesthésié et lors de l'anesthésie les animaux sont placés sur un tapis chauffant. Les animaux sont quotidiennement suivis par le personnel de l'animalerie en étroite collaboration avec l'expérimentateur.

11834 Les applications médicales des nanotechnologies promettent d'améliorer la prise en charge des patients aussi bien au niveau diagnostique que thérapeutique. Récemment a été développé un nouveau nanomatériau appelé "Quantum Rattle" (QR). Il s'agit d'atomes confinés dans une nanobille de silice mésoporeuse. Les QR permettent de délivrer des médicaments mais peuvent aussi servir de produit de contraste pour l'imagerie. Dans le cadre du développement des nanomatériaux QR, nous souhaitons ajouter une méthode alternative dans le but de remplacer et de raffiner l'utilisation des animaux dans le cadre de nos recherches, en effet la tomographie à émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie non invasive. Cette technique permet également de suivre le même animal dans le temps et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés. L'objet de ce travail est de marquer les QR avec un isotope radioactif, le Gallium 68, ainsi cet agent pourra être suivi en TEP. La TEP aura pour but de visualiser *in vivo* et *ex vivo* la biodistribution des QR avec ou sans adressage d'anticorps chez des animaux sains et malades. L'utilisation d'une technique d'imagerie utilisée en clinique chez l'homme, nécessité d'avoir des résultats sur l'animal avant transfert en clinique chez l'Homme. Les expériences *in vitro* ont montrées que les QR ne sont pas cytotoxiques. Il n'existe toutefois pas de modèle *in vitro* ou *in silico* permettant de prédire leur comportement et leur effet après injection systémique.

Des expériences préliminaires de faisabilité et preuve de concept seront réalisées chez 20 rats au total : 10 rats Sprague Dawley sains et 10 modèles de rats Sprague Dawley atteint de glomérulonéphrite extramembraneuse.

Dans un deuxième temps, nous travaillerons sur les applications potentielles de ce nouveau nanomatériau en Néphrologie. Nous recouvrirons ces billes d'anticorps d'adressage spécifique afin de créer des vecteurs permettant l'administration ciblée de médicaments aux différents compartiments rénaux. Notre objectif est d'apporter la preuve de concept de l'utilité thérapeutique des QR dans le modèle de glomérulopathie extramembraneuse du laboratoire. 54 animaux supplémentaires permettront alors d'étudier la pharmacocinétique de différentes combinaisons de QR.

Nos procédures expérimentales induisent peu de douleur et nous mettrons tout en œuvre pour la limiter ainsi que limiter le stress des animaux par la mise en place de protocoles et d'enrichissement. L'utilisation d'une technique d'imagerie utilisée en clinique chez l'homme, nécessité d'avoir des résultats sur l'animal avant transfert en clinique chez l'Homme. Les expériences *in vitro* ont montrées que les QR ne sont pas cytotoxiques. Il n'existe toutefois pas de modèle *in vitro* ou *in silico* permettant de prédire leur comportement et leur effet après injection systémique.

Ce projet utilisera au total 74 rats.

11835 Nos cellules ont besoin de phosphate pour réaliser leurs fonctions les plus basiques, comme s'entourer d'une membrane et maintenir le code génétique. La quantité de phosphate présent dans une cellule dépend de certaines protéines qui se trouvent à la membrane cellulaire et qui laissent passer ou pas cette molécule. On les appelle les transporteurs de phosphate. Dans le cerveau, les seuls transporteurs de ce type sont PiT1 et PiT2.

Bien que leur importance soit connue dans d'autres tissus, comme le foie ou le rein, ils n'ont pas été étudiés dans le cerveau.

En utilisant des cellules du cerveau en culture, nous avons observé que ces transporteurs modulent la forme de ces cellules. Or, ces expériences ne nous permettent pas de savoir si ces changements impactent la fonction des cellules, et donc du cerveau. Seule l'expérimentation animale nous permettra de comprendre l'importance de ces transporteurs pour le fonctionnement du cerveau.

Nous utiliserons des souris de 3 mois pour vérifier notre hypothèse, le nombre de souris nécessaire sera de 640. Pour respecter le principe des 3R, le nombre de souris utilisées sera réduit à son minimum : analyses de paramètre multiples pour chaque souris et utilisation de tests statistiques adaptés.

Notre stratégie sera d'inactiver PiT1 et PiT2 en utilisant des modèles murins spécifiques ou par injection locale dans une région du cerveau importante pour l'apprentissage et la mémoire, l'hippocampe. La chirurgie aura lieu sous anesthésie générale pour éviter toute douleur et des antalgiques sont prévus en post-opératoire. Puis, avec l'aide de différents tests de comportement, nous pourrions évaluer la fonction de cette région, la mémoire, chez ces souris. Pour assurer le bien-être des souris, elles bénéficieront de coton et de « maisons » en carton afin de les occuper et afin qu'elles puissent se construire un « nid ». Les souris seront sous surveillance journalière et des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Cette étude vise à mettre en évidence les rôles insoupçonnés de deux transporteurs de phosphate dans le cerveau. Notre but est de démontrer la participation de PiT1 et PiT2 dans la formation de réseaux importants pour le maintien de nos fonctions cognitives, comme la mémoire.

11836 Les pathologies chroniques du rein conduisent à l'insuffisance rénale terminale, pour laquelle les seuls traitements sont la dialyse et la transplantation. Les mécanismes conduisant à la progression des lésions rénales et à l'insuffisance rénale terminale ne sont pas connus et représentent des cibles thérapeutiques. Déchiffrer ces mécanismes est un des défis majeurs de la recherche en néphrologie.

Les pathologies humaines rénales chroniques avec présence de protéines dans les urines (protéinurie) peuvent être mimées chez les rongeurs, en particulier chez la souris, par une injection unique intraveineuse d'adriamcyine.

Les expériences menées trouvent leur justification dans la nécessité de comprendre les mécanismes physiopathologiques conduisant aux lésions rénales dans l'espoir de développer de nouveaux médicaments permettant de limiter la survenue de l'insuffisance rénale terminale. L'injection unique d'adriamycine chez la souris est un des modèles intégrés reproduisant assez fidèlement un certain nombre de caractéristiques de la pathologie humaine et de ce fait est très informatif.

REST est une protéine qui participe à l'homéostasie cellulaire en modulant la croissance cellulaire, l'adhésion et la transmission du signal.

Le but de ce projet est d'évaluer le rôle de la protéine REST dans la progression des lésions rénales. Nous anticipons que la perte d'expression de REST favorisera le développement d'une protéinurie puis de lésions rénales accélérées. Ces données nous permettront de comprendre précisément son rôle au cours de la protéinurie.

Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées, dont l'expression de REST aura été invalidée spécifiquement dans les cellules rénales. Ces souris ont déjà été rapportées dans la littérature et ne présentent pas de phénotype dommageable. Le nombre d'animaux est justifié par la nécessité d'atteindre des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de souris utilisé sera de 28 au total.

Nous appliquerons donc la règle des "3R" avec :

1-le nombre minimal d'animaux pour avoir la puissance statistique,

2-nous remplacerons dès que possible les expériences animales par des expériences *in vitro*. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas de méthodes alternatives pour réaliser ce travail. Dans un contexte de recherche physiopathologique, l'expérimentation animale ne peut en aucun cas être remplacée par des expériences *in vitro*, où les cellules sont sorties de leur environnement.

3-Enfin, pour éviter toute douleur à l'animal, l'injection intraveineuse rétro orbitaire sera réalisée sous anesthésie générale. Les animaux sont attentivement surveillés et des antalgiques sont prévus en post-opératoire

Les résultats obtenus permettront d'améliorer la connaissance et très certainement le traitement des maladies rénales chroniques.

11837 L'aquaculture représente une alternative aux prélèvements de poissons sauvages dans la nature pour l'alimentation humaine. Pour améliorer les conditions d'élevage des animaux, diminuer ou annuler l'impact des maladies et contribuer à rendre l'aquaculture plus "durable", le développement de vaccins et la sélection d'animaux naturellement plus résistants constituent les deux approches majeures.

Ce projet de recherche vise à

- mieux comprendre les mécanismes de défense des poissons contre leurs pathogènes pour développer de nouveaux vaccins contre des virus pour lesquels il n'en existe pas actuellement ou pour lesquels les vaccins existants ne sont pas parfaitement efficaces. Les poissons sujets à infection expérimentale et /ou vaccination sont analysés par différentes approches immunologiques et moléculaires.

- identifier les bases génétiques de la résistance de la truite aux virus afin de pouvoir sélectionner de manière ciblée des animaux plus robustes et moins sensibles aux maladies. La sensibilité de différentes lignées de poissons à l'infection est déterminée et analysée.

Ce projet s'inscrit dans une démarche compatible avec la règle des 3R :

- les lignées cellulaires (*in vitro*) sont utilisées chaque fois que cela est possible par exemple pour pré-évaluer l'activité d'adjuvants (c'est à dire de composés associés aux vaccins pour augmenter leur efficacité) ; nous avons ainsi développé des lignées cellulaires à partir des différentes lignées isogéniques de truite que nous étudions

- nous veillons à réduire les effectifs de poissons autant qu'il est possible pour obtenir des résultats significatifs, en tenant compte des mortalités estimées pour chaque fond génétique

- nous effectuons les expériences dans un environnement aussi bien adapté que possible pour les truites. Les animaux sont gardés en lots, aucun animal ne sera isolé ce qui est important pour le bien-être des poissons et constitue un élément important d'enrichissement du milieu. Il doit être noté qu'il est important de ne pas introduire dans les bacs des objets sur lesquels les poissons se frottent ; la truite arc-en-ciel peut se blesser sur des objets apparemment anodins.

- des protocoles de suivi individuel sont en cours de mise au point pour diminuer le nombre de poissons utilisés et améliorer la qualité des données obtenues. Il doit être noté que seules les données obtenues à partir du sang des poissons peuvent faire l'objet de cette approche.

Ce projet se décline en 4 procédures qui pourront être répétées plusieurs fois, le nombre total d'animaux utilisés est 2450.

Les expériences durent de 3 à 6 semaines pour des infections expérimentales ; pour les tests de vaccination, les animaux sont gardés le temps que la réponse non spécifique soit terminée, c'est à dire entre 2 et 6 mois selon les protocoles. Les groupes sont de 10 animaux pour effectuer des prélèvements ou de 50 au plus pour évaluer la sensibilité.

L'essentiel des prélèvements est fait post mortem (sauf prélèvements de sang).

L'ensemble des procédures proposées ne pourrait être mise en oeuvre dans des modèles *in vitro*, dans la mesure où les propriétés de sensibilité, ou de réponse aux infections sont à l'échelle de l'individu, et dans une dynamique temporelle de quelques semaines à quelques mois.

Les expériences sont de deux types : (1) sur des alevins, on effectue des infections expérimentales par bain pour évaluer la sensibilité naturelle de différentes souches (2) sur des juvéniles ou des adultes, on effectue des vaccinations et on teste par infection expérimentale par bain ou injection, l'efficacité et les modalités de la vaccination. Les alevins ont une susceptibilité maximale aux virus étudiés et sont employés pour obtenir une sensibilité maximale des tests.

11838 Prévenir le déclin cognitif dans une population où l'on vit de plus en plus âgé, est en enjeu majeur de santé publique. Des recherches antérieures ont montré que les tâches d'orientation spatiale sont idéales pour stimuler les régions cérébrales nécessaires à la cognition d'ordre supérieur. C'est cette dernière qui est particulièrement affectée par le vieillissement.

Dans ce projet, nous allons tenter d'améliorer les capacités intellectuelles d'animaux âgés (souris) par un entraînement cognitif spécifique. Nous développerons des paradigmes d'entraînement sur

un nouvel appareil expérimental : le « JetBall-TFT ». Ce dispositif permettra de montrer aux animaux des vidéos de navigation spatiale en réalité virtuelle (rues, coins de rue, intersections, culs-de-sac...) et d'étudier leur capacité à résoudre les tâches de déplacement dans « le labyrinthe spatial virtuel » qui leur sera présenté. Les animaux se déplacent sur le système comme s'ils s'exerçaient sur un tapis roulant dans un espace de réalité virtuelle. Au total 390 souris normales seront nécessaires à ce projet en incluant les contrôles.

L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet ; les mécanismes de déclin cognitif ne peuvent être remplacés par des systèmes d'études *in vitro*. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Ils bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale. Pour les procédures de chirurgies, la douleur sera prévenue par administration d'opioïdes en pré et post opératoire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien-être.

11839 La tétralogie de Fallot est une pathologie cardiaque congénitale fréquente représentant à elle seule plus de 10% des cardiopathies congénitales. Les anomalies cardiaques caractéristiques de la tétralogie de Fallot sont le plus souvent corrigées chirurgicalement à un très jeune âge, permettant aux patients de vivre dans de bonnes conditions pendant de nombreuses années. Cependant à l'âge adulte, ces patients présentent des dysfonctions ventriculaires droites (contraction inefficace) très souvent accompagnées de troubles du rythme sévères et de mort subite pour lesquels un traitement bien défini n'existe pas encore. Le remplacement de la valve pulmonaire par une prothèse est souvent nécessaire chez ces patients pour limiter la dysfonction du ventricule droit mais le timing optimal pour effectuer cette intervention reste débattu et les conséquences sur l'activité électrique du cœur méconnues.

Ce projet a pour but de caractériser l'électrophysiologie ventriculaire suite à la correction chirurgicale de la tétralogie de Fallot et d'étudier la réversibilité de ces anomalies après le remplacement de la valve pulmonaire. Nous identifierons les mécanismes arythmogènes et leur évolution suite à la revalvulation grâce à une approche intégrative de l'animal *in vivo*, en passant par le cœur explanté, et jusqu'aux mécanismes moléculaires. La caractérisation des mécanismes arythmogènes dans la dysfonction ventriculaire droite permettra d'identifier des cibles thérapeutiques. La caractérisation de la réversibilité de ce remodelage suite au remplacement de la valve pulmonaire à un stade précoce permettra de mettre en évidence les effets bénéfiques de cette procédure et d'identifier de potentielles anomalies résiduelles qui pourraient être ciblées thérapeutiquement.

Ce projet sera développé autour d'un modèle chronique de dysfonction ventriculaire droite chez le porcelet qui mime les lésions d'une tétralogie de Fallot opérée (34 animaux au total). Le nombre d'animaux a été REDUIT au minimum tout en conservant la faisabilité du projet. En effet, on se limite aux seules expériences considérées comme absolument indispensables et selon un protocole expérimental bien défini et bien éprouvé, fournissant évidemment de résultats concluants. Cette espèce, de par la proximité de son anatomie et de son électrophysiologie cardiaque avec celles de l'Homme, facilitera la translation des résultats à la clinique. Cet aspect translationnel ne serait pas retrouvé chez le rongeur chez qui l'anatomie et l'électrophysiologie cardiaque diffèrent et qui complexifierait grandement la mise en œuvre de notre projet au niveau chirurgical et de l'exploration *in vivo* des animaux.

Afin de nous permettre de répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires, il n'est donc pas possible de REMPLACER le modèle animal. Bien que les données obtenues à partir de ces études ne peuvent être obtenues à partir d'études informatiques, elles pourront à terme être incorporées à des modèles numériques et participer ainsi au remplacement et à la réduction du nombre d'animaux utilisés dans de prochaines études, ainsi qu'à leur raffinement.

D'autre part, nous sommes en mesure de pratiquer la plupart des différentes investigations à la suite les unes des autres ce qui nous permettra d'accroître la quantité d'informations obtenues à partir d'un animal et ainsi de limiter l'utilisation globale d'animaux.

Le projet est réalisé avec un suivi chronique, le bien être des animaux sera particulièrement pris en compte lors de leur prise en charge, toutes les mesures de RAFFINEMENT seront mises en place : anesthésie, suivi des constantes, analgésie, compétences des personnels, conditions d'hébergement et mesures d'enrichissement adaptées.

11840 Ce projet consiste en une étude comparative des bases comportementales et cérébrales du traitement des vocalisations conspécifiques (CV) chez 3 espèces de primates : l'humain, le macaque rhésus et le marmouset commun. En effet ces trois espèces utilisent les CV dans leur communication et des résultats récents suggèrent la présence dans le cerveau de chaque espèce de « patches vocaux », régions corticales montrant une activité particulièrement élevée en réponse aux CV. Le projet a pour but : (1) de comparer les trois espèces au moyen de tests comportementaux similaires (catégorisation CV/non-CV, discrimination d'identité du locuteur) via des systèmes de tests automatisés accessibles à volonté par les singes ; (2) d'utiliser l'IRM fonctionnelle comme une technique de neuroimagerie peu invasive pouvant être utilisée chez les trois espèces pour comparer les réponses corticales aux CV et tester l'hypothèse d'un système de patches vocaux conservé chez les primates – comme c'est le cas pour les « patches de visages » du cortex visuel.

La partie du projet présentée ici concerne les expériences réalisées chez le marmouset. Les animaux consisteront en trois groupes familiaux de marmousets communs (*Callitrix jacchus*), initialement 3 couples reproducteurs puis leur progéniture (n=20 individus maximum). Seuls les individus adultes seront inclus dans les expériences d'IRM ; tous les individus pourront accéder librement aux systèmes de test comportemental attachés à leur volière.

Ce projet devrait considérablement augmenter notre connaissance de l'architecture fonctionnelle cérébrale responsable du traitement de l'information vocale chez les primates, et permettre de mieux comprendre comment la parole a émergé chez l'humain. Il permettra notamment une comparaison des patrons d'activation cérébrale entre groupes de sujets de taille comparable entre espèces (un manque criant dans la littérature) et une évaluation robuste de la variabilité interindividuelle et de la latéralisation cérébrale des patches vocaux. Les dommages attendus sont relativement minimes, puisque la technique d'imagerie cérébrale utilisée principalement, l'IRM fonctionnelle - est peu invasive. Aucune mise à mort n'est prévue dans ce projet.

Remplacement. Il s'agit d'une étude comparative qui par définition implique de comparer l'humain à d'autres espèces. Il est donc inévitable pour ce projet d'avoir recours aux animaux.

Réduction. Il est prévu d'étudier trois groupes familiaux dont le nombre d'individus total sera limité à n=20. Il y a deux raisons essentielles pour ce nombre relativement élevé : (1) Il se rapproche de la taille des groupes observés dans le milieu naturel (typiquement 6-9 individus) permettant des interactions sociales riches qui favorisent le bien être du groupe, une meilleure survie des nouveaux nés, et sans doute contribue à leur curiosité et motivation pour effectuer les tâches comportementales ; (2) Il rend possible une comparaison robuste aux données IRM fonctionnelle humaines sur la base de groupes de sujets de taille comparable, un aspect crucial de cette étude comparative, et est essentiel pour obtenir une évaluation robuste de la variabilité interindividuelle, notamment de la latéralisation cérébrale des patches vocaux.

Raffinement. La majeure partie des procédures envisagées sont de classe légère à modérée, notamment de par l'accès volontaire aux tests comportementaux, et de par l'utilisation d'une technique d'imagerie peu invasive, pour laquelle une sédation sera utilisée afin de diminuer le stress de l'animal.

11841 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie de la rétine provoquée par une dégénérescence progressive de la macula, partie centrale de la rétine, qui apparaît le plus souvent

à partir de 65 ans. En France, environ 1,5 millions de personnes seraient atteintes de DMLA. C'est la principale cause de cécité non corrigeable chez les personnes âgées dans les pays industrialisés. Les causes précises de cette maladie ne sont pas connues et les mécanismes peu compris. Il existe deux formes de DMLA : atrophique et exsudative. La forme atrophique ou « sèche » est essentiellement caractérisée par une dégénérescence rétinienne responsable de la perte de vision irréversible. La forme exsudative (ou "humide") correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau de la choroïde qui, à terme, peuvent provoquer des hémorragies sous-rétiniennes et accélérer l'évolution vers la cécité. Les 2 formes présentent invariablement une inflammation chronique caractérisée par l'accumulation des cellules inflammatoires dans l'espace sous-rétinien. Les traitements existants permettent seulement de ralentir l'évolution de la formation de vaisseaux pathologiques, cependant aucun traitement n'est disponible pour cibler l'inflammation. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et notamment inflammatoire, devrait permettre de prendre en charge les formes sèches de la DMLA et d'améliorer l'efficacité des traitements des formes humides.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la participation des monocytes spléniques dans l'inflammation sous-rétinienne et de déterminer le rôle de l'angiotensine II dans ce mécanisme.

Nous étudierons ces mécanismes sur des souris âgées et des souris sur lesquelles nous induirons une inflammation sous-rétinienne via une exposition des animaux à une lumière ou des impacts laser sur les vaisseaux de la rétine.

Ces expérimentations seront menées sur des modèles murins présentant une prédisposition à développer des inflammations sous-rétiniennes et des souris normales.

Au total, 1152 animaux seront nécessaires à cette étude en incluant les contrôles.

L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet ; la DMLA est le résultat d'une interaction complexe entre différents types cellulaires juxtaposés et ne peut être complètement modélisée par des modèles cellulaires *in vitro*. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Ils bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale. Pour les procédures de chirurgies, la douleur sera prévenue par administration d'opioïdes en pré et post opératoire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien-être.

11842 Le taux de personnes atteintes de pathologies métaboliques (syndrome métabolique, diabète) est en constante hausse. Le principal facteur de morbi-mortalité chez ces patients est représenté par les maladies cardiovasculaires. De nombreuses études ont mis en évidence des liens entre l'adiposité cardiaque (tissu adipeux épicaudique et lipides intracardiaques) et l'altération de la fonction cardiaque chez ces patients. Ceci passerait par une dérégulation du métabolisme, entraînant la création d'un environnement délétère par l'activation de processus inflammatoires et l'apparition de stress oxydant.

La vitamine D fait aujourd'hui l'objet d'un nombre croissant d'études car il semblerait qu'elle soit capable d'exercer de multiples effets sur le métabolisme. Des études chez l'Homme ont établi un lien entre carence en vitamine D, pathologies métaboliques et risque cardiovasculaire accru. La supplémentation en vitamine D pourrait donc potentiellement être une approche thérapeutique permettant d'atténuer les altérations de la fonction cardiaque observées chez les patients souffrant de pathologies métaboliques. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a évalué les effets d'une supplémentation en vitamine D sur l'adiposité, le métabolisme et la fonction cardiaques.

Les altérations de la fonction cardiaque chez les sujets atteints d'une pathologie métabolique résultent d'un ensemble complexe d'interactions entre les différents tissus et impliquent des processus (inflammatoires par exemple) d'origines aussi bien systémiques que locales, évoluant suivant le développement de la pathologie et qui ne peuvent être fidèlement et complètement

reproduits *in vitro* afin d'élucider les effets d'une supplémentation en vitamine D3 et ses mécanismes d'action, qui pourraient, par ailleurs, impliquer un effet systémique.

L'objectif de cette étude sera donc d'évaluer, chez un modèle de souris obèse et diabétique, les effets d'une supplémentation en vitamine D3 (cholécalférol) sur l'adiposité, le métabolisme et la fonction cardiaques, et de caractériser les mécanismes intervenant dans les processus observés.

Dans ce but, 90 souris seront nécessaires afin de pouvoir mener à bien toutes les analyses fonctionnelles, histologiques et biochimiques. Des évaluations longitudinales (échocardiographie, mesure des pressions artérielles et test de tolérance à l'insuline) seront réalisées afin de pouvoir suivre l'évolution des paramètres d'intérêt tout au long du protocole, chaque souris étant son propre contrôle, ce qui permettra de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 Rs :

Remplacement : A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant d'étudier les effets d'une supplémentation en vitamine D3 sur la fonction cardiaque. En effet, les altérations de la fonction cardiaque chez les sujets atteints d'une pathologie métabolique résultent d'un ensemble complexe d'interactions entre les différents tissus et impliquent des processus (inflammatoires par exemple) d'origines aussi bien systémiques que locales, évoluant suivant le développement de la pathologie. Les effets de la supplémentation en vitamine D3 sur la fonction cardiaque pourraient ainsi impliquer un effet systémique. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'homme.

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

Raffinement : Dans un souci de raffinement, il a été prévu d'utiliser un enrichissement de l'environnement sous forme d'igloos, de tubes, de coton pour permettre la création de nids et de bâtonnets en bois à ronger.

11843 L'angiogenèse est un processus biologique qui consiste en la formation de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus est conduit par les cellules endothéliales. Il est fondamental pour la cicatrisation des tissus et le développement embryonnaire. Cependant, l'angiogenèse aggrave de nombreuses maladies telles que le cancer et les pathologies inflammatoires chroniques. Une dérégulation de ce processus est responsable des rétinopathies.

D'autre part, les connexines constituent une famille de protéines transmembranaires qui s'assemblent pour former les jonctions communicantes permettant ainsi de synchroniser les fonctions cellulaires. Récemment, nous avons identifié un rôle pour ces protéines au cours de l'angiogenèse tumorale.

Dans ce contexte, le projet vise à mieux comprendre le rôle de ces protéines au cours du processus angiogénique mais aussi à déterminer si elles représentent une cible thérapeutique pour le développement de nouvelles stratégies anti-angiogéniques. Ainsi, nous proposons de réaliser une étude *in vivo*, afin d'évaluer l'effet d'une inhibition locale des jonctions communicantes sur l'angiogenèse au cours de la vascularisation de la rétine chez la souris. En effet, chez la souris, la vascularisation de la rétine intervient après la naissance de manière très contrôlée et reproductible permettant une analyse très fine de l'angiogenèse. La vascularisation de la rétine du souriceau est de ce fait un modèle bien établi pour étudier l'angiogenèse *in vivo*.

En pratique, la procédure que nous souhaitons réaliser consiste en l'administration au niveau des yeux des souriceaux d'un produit inhibiteur des jonctions communicantes pour tenter de bloquer la croissance des vaisseaux sanguins.

Pour cette étude, nous prévoyons d'utiliser 42 animaux (6 lots de 7 souris). Les procédures seront réalisées par du personnel formé à l'expérimentation animale et en accord avec la règle des 3R qui préconise : le Remplacement des animaux par une méthode alternative quand cela est possible (nous souhaitons évaluer l'effet d'une nouvelle molécule sur l'angiogenèse, par conséquent nous sommes contraints d'utiliser un modèle animal car seuls les modèles d'angiogenèse *in vivo* récapitulent l'ensemble des étapes du processus et permettent d'évaluer l'effet global et les

éventuels effets secondaires d'un inhibiteur.) ; la Réduction du nombre d'animaux (nous allons inclure 42 animaux dans cette étude repartis en 6 groupes de 7 animaux. Pour chaque groupe, nous avons pris en compte : (1) la difficulté d'administration locale de l'inhibiteur (intraoculaire), (2) des difficultés inhérentes à la microdissection et à la fixation des rétines néonatales et (3) de la variabilité expérimentale. D'autre part, le sexe des animaux n'étant pas un critère d'exclusion, le nombre de portée sera réduit.) ; le Raffinement favorise le comportement naturel des animaux pour éviter tout stress (nous serons, dans ce cadre, attentifs à l'enrichissement du milieu (litière, abris) mais également nous veillerons au bon comportement de la mère vis-à-vis des souriceaux. Des points limites seront établis afin d'éviter toute souffrance inutile des animaux (poche de lait, non isolement). La procédure d'injection sera réalisée sous anesthésie générale et une médication adéquate sera administrée. Des observations quotidiennes seront réalisées afin de s'assurer du bien-être des animaux.

11844 L'objectif de ce projet est d'étudier la possibilité de mettre au point un modèle de carcinose péritonéale chez le rat. A l'heure actuelle, la plupart des modèles mis en œuvre dans le domaine de la cancérologie expérimentale ont été développés chez la souris. Pour certains travaux de recherche, la souris s'avère néanmoins un sujet d'étude trop petit pour lequel il n'existe pas d'outils permettant d'étudier de façon pertinente le modèle. C'est ainsi que le rat devient un modèle d'intérêt croissant compte tenu de sa taille plus importante.

La carcinose péritonéale constitue l'atteinte plus ou moins diffuse du péritoine par une tumeur maligne le plus souvent d'origine ovarienne, colorectale, gastrique ou pancréatique. Elle est en général le signe d'une maladie évoluée et associée à une faible survie (médiane de survie de 3 à 12 mois).

Dans ce contexte et en prévision d'études menées avec des chercheurs travaillant sur la prise en charge de la carcinose péritonéale, nous souhaitons développer un modèle de cette pathologie chez le rat.

La présente saisine concerne donc 50 rats maximum, qui seront étudiés par échographie et imagerie de bioluminescence.

Ce projet sera mené conformément à la règle des 3R : examens d'imagerie non invasive sur animaux anesthésiés, qui ne susciteront pas de stress important à l'animal (raffiner). Le nombre d'animaux sera réduit au minimum avec 50 rats maximum qui seront utilisés (réduire). Le développement de modèles animaux reste nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de modèles représentatifs de la complexité d'un organisme entier ni de cette pathologie (remplacer).

11845 L'autisme est caractérisé par une communication sociale atypique, ainsi que des comportements restreints et stéréotypés. Cette maladie, extrêmement répandue, touche environ une personne sur 100. Ce trouble est marqué par une hétérogénéité importante. En plus d'une part génétique, il semble que de nombreux facteurs environnementaux puissent être à l'origine de l'autisme. Parmi eux, de nombreuses données cliniques et pré-cliniques soulignent l'imputabilité probable de l'Activation du système Immunitaire de la Mère (MIA) durant la grossesse dans l'apparition de l'autisme dans la descendance. Il semble que cette MIA entraîne des modifications neuro-immunologique qui seraient responsables des symptômes autistiques dans la descendance. Notre laboratoire s'attache à comprendre les mécanismes moléculaires à la base des comportements atypiques observés chez les personnes avec autisme. Les marqueurs de l'autisme sont donc principalement comportementaux en l'état actuel des connaissances, ce qui implique que l'étude des mécanismes de l'autisme ne peut se faire que sur l'animal vivant. Nous étudierons donc le comportement de souris autistes, générés par MIA chez la mère, que nous comparerons à d'autres lignées de souris témoins. Notre objectif est ensuite de déterminer l'efficacité d'une immunothérapie par faible dose d'interleukine 2 afin de traiter les symptômes comportementaux chez ces modèles de souris autistes générés par MIA. Ce projet a donc un objectif principal thérapeutique mais a également pour vocation de faciliter la compréhension des mécanismes neuro-immunologique de l'autisme. La souris est un modèle validé en immunologie et particulièrement pour les études de développement de nouvelles immunothérapies et dont le comportement est suffisamment connu

pour être étudié en tant que modèle dans l'autisme. Nous nous concentrons principalement sur les anomalies de la communication sociale, tout en contrôlant les autres comportements tels que les comportements stéréotypés et répétitifs. Nous nous efforcerons de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés en ajustant au mieux les protocoles pour obtenir des résultats statistiques robustes tout en tenant compte de la variabilité inter-individuelle des animaux testés. Les expériences comportementales réalisées ne sont pas considérées comme invasives et n'engendrent qu'un stress limité et très ponctuel. Les animaux sont autant que possible hébergés en groupe (tant que les protocoles le permettent), pour respecter leur vie sociale. Au total, 134 souris seront utilisées dans l'ensemble du protocole.

11846 L'hémorragie intracérébrale spontanée (HICS) ou accident vasculaire cérébral hémorragique (AVC hémorragique) est un type d'AVC qui résulte de la rupture spontanée d'un vaisseau sanguin cérébral. L'AVC hémorragique représente 10 à 15% des AVC enregistrés, et mène au décès dans 30 à 50% des cas, lors des 30 premiers jours. En effet, l'AVC hémorragique entraîne la formation d'un hématome intracranial qui mène à une compression cérébrale, réduisant l'apport de sang vers le cerveau (coma) et à la mort neuronale, due à la toxicité du sang. Tout ceci entraîne des lésions irréversibles. A l'heure actuelle, aucun traitement spécifique pour l'AVC hémorragique n'est enregistré, seule des solutions de décompression cérébrale par ouverture de la boîte crânienne sont occasionnellement réalisées.

Nous avons généré une molécule innovante afin de liquéfier l'hématome (thrombolyse) résultant de l'hémorragie. Une formulation galénique spécifique lui confère une diffusion lente, permettant d'améliorer l'efficacité de cette molécule. Ainsi, notre stratégie thérapeutique additionnée à une chirurgie micro-invasive (MIS) permettra de drainer le sang de l'hématome, en dehors du cerveau, afin de restaurer la pression cérébrale et de limiter la mort neuronale, pour améliorer le devenir des patients.

Des études *in vitro* (ex : sur caillots de sang humain) ont été effectuées au préalable pour tester notre solution thérapeutique. Cela nous a permis d'avoir une bonne vision de ses bénéfices. Nous souhaitons que cette solution thérapeutique soit testée chez l'Homme dans le futur, ainsi il faut évaluer l'interaction de cette solution thérapeutique avec son organe cible, le cerveau. Pour cela, il est nécessaire de tester la tolérance et la sécurité de la molécule ainsi que sa forme galénique sur un organisme entier. Dans notre projet, nous souhaitons comparer notre stratégie thérapeutique à une molécule thrombolytique de référence, le tPA (Altéplase).

Notre projet se base sur 160 souris (de lignée "Swiss") mâles de 8 à 10 semaines. Ce nombre a été calculé grâce un test d'analyse de puissance statistique. Pour comparer notre solution thérapeutique à l'Altéplase, nous injecterons, sous anesthésie générale et avec une analgésie adaptée, les produits à tester directement dans le cerveau. Afin de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisé, une méthode d'étude non invasive comme l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) sera pratiquée pour évaluer l'impact de notre stratégie thérapeutique sur le tissu cérébral. De plus, des analyses complémentaires seront effectuées au niveau cellulaire. Ce projet comprend 5 étapes échelonnées afin de réduire le nombre d'animaux le cas échéant.

Afin de garantir le bien-être des animaux de cette étude, les souris seront logées en groupe dans un milieu enrichi. Elles auront accès à l'eau et à la nourriture sans restriction. Par ailleurs, le suivi sera réalisé par du personnel formé.

D'autre part, nous avons suivi la règle des 3R, qui est Remplacement (des animaux par des méthodes alternatives), Réduction (du nombre d'animaux), et enfin, Raffinement (utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques adaptés pour prévenir toute souffrance). En effet, nous avons remplacé au maximum les animaux en ayant au préalable effectué des études *in vitro* (par exemple sur du sang humain). Le nombre de souris a été réduit à son minimum grâce à un test d'analyse de puissance statistique et grâce à l'utilisation d'une méthode d'étude non invasive, l'IRM. Et enfin, dans un souci de raffinement, les souris recevront une anesthésie et analgésie adaptées pour prévenir au maximum une potentielle angoisse ou douleur.

11847 Aujourd'hui, des thérapies ciblées sont associées à la chimiothérapie et la radiothérapie lors d'un traitement anti-tumoral. Nous avons découvert que l'efficacité des traitements de chimiothérapie et radiothérapie est dépendante de la réponse immunitaire anti-tumorale qu'ils déclenchent à travers le mécanisme de la mort cellulaire immunogène (ICD, de l'anglais « immunogenic cell death »). Nous sommes intéressés à comprendre si l'efficacité des thérapies ciblées dépend de l'activité du système immunitaire. Nous sommes intéressés par les inhibiteurs d'ALK (de l'anglais « Anaplastic lymphoma kinase ») qui est responsable du lymphome pédiatrique anaplastique à grandes cellules (ALCL) et un sous-type de cancer du poumon non a petites cellules (NSCLC). Nous avons déjà testé la capacité de deux inhibiteurs d'ALK à induire les marqueurs de l'ICD *in vitro*. Nous voulons, dans le cadre de ce projet, tester leur capacité à induire une réponse immunitaire, expérience nécessitant l'implication d'un système immunitaire dans son ensemble et devant donc être réalisée *in vivo*. Ce projet permettra ainsi de comprendre si les thérapies ciblées ont besoin d'un système immunitaire fonctionnel pour leur activité antitumorale, donc, il permettra de mieux sélectionner les patients qui vont bénéficier de ces thérapies ciblées. Ce projet d'une durée de 5 ans prévoit des expériences de croissances tumorales dans des souris immunocompétentes et immunodéficientes. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Ce projet nécessite l'implication d'animaux vivants car il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire *in vitro/ex vivo* du fait de sa complexité. Nous avons choisi le modèle souris car notre projet s'applique à étudier l'implication du système immunitaire dans la lutte anti cancéreuse. La souris est le mammifère le plus utilisé en expérimentation animale (suffisamment petit pour en avoir un certain nombre, facile à manipuler et suffisamment grand pour pouvoir recevoir des injections de cellules tumorales). Le nombre d'animaux par groupe (10) est un compromis entre réduction et nombre d'animaux suffisants pour obtenir des résultats significatifs étant donné la complexité de chaque modèle. Le nombre de groupes proposés inclut les groupes contrôles nécessaires. Les expérimentations seront par ailleurs regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Ce projet nécessitera au maximum 4800 souris. L'étude est divisée en plusieurs procédures et sera arrêtée si une des procédures invalide l'hypothèse de travail ; le nombre de souris sera ainsi diminué. Par ailleurs, une veille bibliographique constante sera faite pour éviter toute manipulation déjà rapportée dans la littérature. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Le personnel impliqué dans ce projet est qualifié et expérimenté sur le plan technique et par ailleurs formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Au cours de l'expérimentation, les animaux seront hébergés dans le respect de leur bien-être (maximum 5 souris par cage) et disposeront de coton dans les cages. Les animaux seront acclimatés pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. La surveillance régulière permettra le suivi du comportement (prostration, autoagression, etc) et de la croissance tumorale, afin d'euthanasier les animaux dès qu'ils atteignent un point limite.

11848 La souris glaneuse (*Mus spicilegus*) est décrite dans la littérature comme une espèce présentant une organisation sociale de type monogame. Un mode de vie monogame est généralement défini à partir d'une variété de critères comportementaux et morphologiques. Parmi les critères comportementaux figure en premier l'émergence et le maintien d'un lien sélectif entre partenaires sexuels adultes. Comparativement à son homologue monogame, le campagnol des prairies (*Microtus ochrogaster*), la souris glaneuse a, à ce jour, fait l'objet de peu d'études systématiques sur l'émergence et la force d'un lien d'un lien préférentiel entre partenaires sexuels.

Le choix du partenaire constitue un élément fondateur du couple monogame. Nous posons comme hypothèse que les individus s'étant mutuellement choisis établiront un lien social plus intense que des individus ne s'étant pas mutuellement choisis. Notre protocole prévoit donc d'utiliser un dispositif dans lequel chaque mâle et chaque femelle aura le choix entre deux partenaires de sexe opposé au sien. Nous nous proposons donc d'établir des couples d'individus en respectant ou non ce choix du partenaire et d'ensuite d'évaluer le lien affiliatif entre les membres de ces couples.

Ces liens affiliatifs seront évalués d'une part, par des tests de séparation réunion des 2 individus au cours desquels les réponses comportementales, les vocalisations ultrasonores et les modifications

thermiques infrarouge périphériques (reflétant les réponses du système nerveux autonome) seront évalués.

D'autre part le lien entre les partenaires sera évalué par un test de biais de jugement consistant à mesurer la réponse cognitivo-émotionnelle des individus en réponse à un stimulus ambigu. Dans ce test les animaux ont appris que des récompenses alimentaires leur sont fournies en réponse à un signal. Deux types de signaux sont acquis. L'un d'eux correspond à une forte récompense alimentaire, un autre à une récompense plus faible. Les réponses comportementales des animaux varient selon les deux types de récompense. Le test de biais de jugement se déroule alors en présentant un stimulus de nature intermédiaire entre les deux stimuli connus. La réponse des animaux à ce nouveau stimulus sert d'indicateur de leur évaluation plus ou moins positive de cette situation. Notre hypothèse est alors que les animaux ayant établi un fort lien avec leur partenaire et donc vivant dans un couple plus harmonieux apprécieront plus positivement cette situation ambiguë en adoptant une réponse comportementale proche de celle manifestée en réponse au stimulus correspondant à la forte récompense.

Nous nous attendons donc à ce que les couples de souris glaneuses présentent une forte hétérogénéité dans leur lien social, et dans les réponses à la séparation, selon que leur partenaire corresponde ou non au partenaire initialement choisi.

Parallèlement à cette étude menée sur les souris glaneuses monogames, et afin d'obtenir un élément de comparaison avec une espèce polygyne, le même protocole sera réalisé avec des souris domestiques (*Mus musculus domesticus*).

Nous posons également l'hypothèse que chez la souris domestiques les séparations du congénère aient moins de conséquence, et les biais de jugement des individus soient moins tributaires du fait que leur partenaire corresponde ou non à leur choix initial.

Remplacement : La question posée ici est relative à l'importance du choix du partenaire dans l'établissement d'un couple monogame. Répondre à ce type de problématique implique l'observation des comportements sociaux et reproducteurs des partenaires en présence. Aucune stratégie de remplacement n'est à l'heure actuelle disponible.

Réduction : Les effectifs retenus sont de 36 souris glaneuses (18 couples) et de 36 souris domestiques (18 couples), soit un total de 72 animaux. Ces effectifs correspondent à un minimum requis afin d'obtenir une gamme de couples aux degrés d'affinité variés, permettant ainsi de mener une analyse statistique valide dans laquelle l'unité prise en considération est le « couple » d'individus. À l'issue de cette étude, notre protocole prévoit la mise à mort des individus. Toutefois, ceux-ci pourront éventuellement être utilisés dans un autre protocole, après avis du vétérinaire de notre établissement, si un nouveau projet compatible avec l'emploi de ces animaux se présente.

Raffinement : Les animaux sont hébergés dans des cages ou dispositifs de tests similaires à des cages standards. Les manipulations des animaux ne se font que par l'emploi de boîte (ou tube) dans lesquels les animaux sont incités à entrer, évitant ainsi la manipulation directe des animaux, qui source de stress. Les interactions sociales des individus sont quotidiennement surveillées et des tubes de carton sont fournis aux animaux pour qu'ils puissent se soustraire des interactions agonistiques éventuelles de leur congénère.

11849 L'immunosurveillance consiste en l'élimination des cellules (pré)malignes au cours de l'oncogenèse. Toutefois, les cellules cancéreuses peuvent déjouer ce système en inhibant activement la réponse immunitaire ou en échappant à la reconnaissance par les effecteurs immunitaires. Cependant, la réactivation de l'immunosurveillance notamment par des anticorps bloquant les freins de la réponse immunitaire ont un effet anti-tumoral réel. Notre équipe a montré qu'il existe une mort dite immunonogénique - capable de provoquer une réaction immunitaire - des cellules tumorales qui permet le recrutement des cellules dendritiques (CDs), seules capables de réaliser une présentation antigénique croisée c'est-à-dire de capter, cliver, et présenter des antigènes extracellulaires (comme ceux des cellules tumorales) aux lymphocytes T cytotoxiques (LTc). Ce projet a pour but d'identifier l'implication de la présentation croisée dans le succès des immunothérapies anti-tumorales ce qui pourrait conduire, à terme, à l'identification de nouveaux

biomarqueurs et cibles thérapeutiques pour l'immunothérapie anti-tumorale. Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale dans des systèmes *in vitro*. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris immunocompétentes normales (n. 3148) et transgéniques (n.960), qui présentent un phénotype complètement normal. Ce projet se dessine sur 5 ans et implique des expériences de croissance tumorale et vaccination. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum* ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

11850 *Sterculia setigera* est une plante de la famille des Sterculiaceae, utilisée en médecine traditionnelle au Togo pour soigner les affections du système nerveux central telles que l'épilepsie. Cette plante a été sélectionnée avec deux autres espèces pour cette étude à l'issue d'une enquête ethnobotanique réalisée sur l'ensemble du territoire Togolais entre juillet et septembre 2014, et dont les résultats ont récemment été publiés dans le « Journal of Ethnopharmacology ». Des tests *in vitro* réalisés au laboratoire sur des neurones en grain du cervelet de rats en culture primaire en présence du peroxyde d'hydrogène ou de 6OHDA, deux substances neurotoxiques, ont montré une neuroprotection par l'amélioration du taux de survie des neurones exposés à ces neurotoxiques précités. Des 3 plantes étudiées, le meilleur indice de protection a été obtenu avec l'extrait hydro-éthanolique de *Sterculia setigera*. Plusieurs études récentes montrent par ailleurs l'effet bénéfique de l'utilisation des plantes dans l'alimentation et les soins de santé, notamment par l'amélioration du potentiel antioxydant des organes les plus vulnérables aux attaques radicalaires tels que le cerveau. De plus, les plantes demeurent encore à ce jour une des meilleures sources pour la découverte de nouvelles molécules bioactives. Le projet présenté ici vise à confirmer chez l'animal l'effet neuroprotecteur observé *in vitro*. Les premiers tests ayant été réalisés sur des neurones du cervelet, nous avons décidé de démarrer l'étude *in vivo* en ciblant la même partie du cerveau : le cervelet. Notre choix s'est tourné vers le rat pour deux raisons majeures ; 1/ le développement du cervelet murin se déroule essentiellement après la naissance, comme chez l'homme, et 2/ le cervelet du rat présente comme tous les mammifères de fortes similitudes avec le cervelet humain et assure les mêmes fonctions : posture et équilibration ; ce qui facilite l'extrapolation des résultats. Ce projet utilisera 288 animaux. Afin de respecter la règle des 3R, nous avons sélectionné préalablement à cette étude *in vivo* la plante parmi plusieurs qui présentait l'effet neuroprotecteur le plus puissant.

11851 A travers le monde, plus d'1 milliard de personnes fument. La cigarette tue plus de 7 millions de personnes chaque année, environ 890000 sont des non-fumeurs exposés à la fumée. 15 à 25% des femmes fument durant leur grossesse.

Des études épidémiologiques ont montré que les enfants exposés *in utero* au tabac, comporte des risques spécifiques :

Un poids de naissance moyen plus faible, une probabilité de mortalité augmentée de mort subite du nourrisson.

En grandissant, l'enfant peut présenter des troubles du comportement, tel que des troubles de l'hyperactivité avec déficit de l'attention, des troubles de l'apprentissage et une augmentation des risques d'addiction à l'âge adulte.

La fumée de cigarette est composée de plus de 4000 substances dont au moins 50 cancérogènes. La nicotine est la substance entraînant la dépendance en agissant sur le système nerveux central. Des études menées sur la souris ont montré, qu'une exposition prénatale à la nicotine entraînait un comportement similaire à ceux rencontrés chez l'homme. La nicotine, agoniste des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, perturbe la mise en place du système cholinergique. Non seulement en perturbant l'activité neuronale mais aussi la formation du réseau neuronal en affectant la croissance des neurones, la synaptogenèse et l'axogenèse.

Ce projet vise à comprendre comment l'activité neuronale précoce et la neurotransmission cholinergique coordonnent les différents processus cellulaires qui définissent l'architecture spécifique d'un réseau neuronal. Les modèles animaux sont indispensables à ces études, car il est impossible de reproduire fidèlement ces processus neurobiologique, *in silico* et/ou *in vitro*.

Nous avons choisi le poisson zèbre comme modèle, d'une part, son système cholinergique présente une grande homologie avec celui des mammifères, d'autre part, il est facile à maintenir et à héberger. Une femelle de poisson zèbre peut pondre de 100 à 200 œufs par semaine. De plus, le développement embryonnaire hors de la femelle, permet de travailler sans sacrifier la mère. Enfin la transparence des embryons aux stades qui nous intéressent permet des études en imagerie sans recours à la chirurgie invasive.

Pour l'ensemble du projet, nous utiliserons 1750 poissons au maximum et 26 lignées. Les expérimentations sont limitées au minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Nous réduirons au maximum la fréquence des accouplements et l'ensemble des embryons sera utilisé. Nous assurons également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

Les conditions d'hébergement des animaux sont contrôlées afin de préserver le bien-être de l'animal et d'enrichir son environnement. Les animaux seront utilisés aux stades adultes et 7 dpf.

Nous satisfaisons à la règle des 3R du règlement REACH et le décret N°2013-118 sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

11852 Le projet vise à réaliser et utiliser des modèles murins d'arythmies cardiaques au moyen de vecteurs viraux. Notre projet de recherche s'intéresse aux arythmies cardiaques héréditaires mortelles issues d'anomalies de fonctionnement de canaux ioniques cardiaques. Des mutations de l'ADN codant pour l'un de ces canaux ont été identifiées chez des patients présentant des arythmies héréditaires et leurs conséquences sur la fonction du canal ont été étudiées *in vitro*. Cependant, les modèles d'étude *in vitro* à notre disposition sont limités et ne permettent pas d'extrapoler nos résultats à l'être humain. C'est la raison pour laquelle il nous semble prometteur de tenter de créer de nouveaux modèles animaux d'étude des mutations dans les canaux ioniques cardiaques au moyen de vecteurs viraux. De tels modèles permettront d'étudier *in vivo* les conséquences pathophysiologiques de ces mutations et de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués.

La surexpression se fera en utilisant des vecteurs viraux portant le canal ionique cardiaque muté injectés par voie systémique à des souris. Les conséquences des mutations sur la fonction cardiaque et les courants ioniques seront étudiées respectivement par des enregistrements échocardiographiques et électrocardiographiques sur l'organisme entier, et par enregistrements électrophysiologiques des courants sur les cellules cardiaques isolées après euthanasie des animaux. Des études biochimiques et immunohistochimiques sur tissus permettront l'étude au niveau moléculaire des conséquences de ces mutations.

D'autre part, nous souhaitons utiliser un modèle murin existant de déficience d'un gène codant pour un canal ionique afin de tester l'effet thérapeutique potentiel de la surexpression de ce canal ionique, ou de fragments du canal, sur les conséquences fonctionnelles de cette déficience chez la souris.

L'utilisation de vecteurs viraux dans ces différents types de modèles murins nous permettra, d'une part, d'étudier *in vivo* les conséquences de mutations humaines et, d'autre part, de tester des thérapies sur un modèle transgénique.

Nous utiliserons au maximum 264 souris C57BL6 en 5 ans pour la réalisation de ce projet.

Dans nos protocoles et analyses, nous prendrons les mesures suivantes pour appliquer la règle des trois R :

1) Raffinement : Afin de réduire au maximum la douleur chez les animaux utilisés, nous injecterons les virus (dilués dans une solution physiologique) par voie systémique, ce qui évite la chirurgie cardiaque lourde liée à une injection intracardiaque. D'autre part, les caractéristiques physiologiques cardiaques de la maladie seront évaluées par des méthodes non invasives : enregistrements échocardiographiques et électrocardiographiques.

Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour réduire au maximum toute douleur, souffrance ou angoisse que pourraient subir les animaux.

2) Réduction : Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons les contrôles les mieux adaptés et les virus ne seront injectés qu'après avoir été titrés *in vitro* et lorsque ce titre sera suffisant pour obtenir un effet *in vivo*.

Nous utiliserons les tests non paramétriques de Wilcoxon et Kruskal-Wallis pour petits effectifs.

3) Remplacement : Le myocyte cardiaque adulte ayant atteint un état de différenciation terminale, il ne se divise pas, il ne peut être conservé en culture primaire plus de quelques jours et il ne peut être transfecté par les agents de transfection non viraux. D'autre part, aucun modèle d'expression *in vitro* ne reproduit les conditions physiologiques spécifiques du cardiomyocyte (expression de protéines spécifiques dans des domaines cellulaires spécifiques). De ce fait, l'utilisation d'animaux ne peut être remplacée par des modèles d'expression *in vitro* ou *ex vivo*.

Pour conclure, ces modèles murins d'arythmies cardiaques constitueront d'excellents outils pour appréhender les mécanismes physiopathologiques des maladies dues au dysfonctionnement de canaux ioniques cardiaques ; ils permettront d'évaluer, *in vivo*, les conséquences de mutations dans ces canaux, et de tester l'éventuel effet thérapeutique de la surexpression de canaux ioniques ou de fragments de canaux.

11853 L'utilisation des nanoparticules (NPs) dans de nombreux domaines industriels (cosmétique, automobile, BTP, textile, etc.) pose la question de leur impact sur la santé et l'environnement. Suivant leurs propriétés physico-chimiques (nature, taille, forme, chimie de surface, etc.), elles sont susceptibles d'avoir un comportement et un impact différents les unes des autres. Ainsi, pour évaluer les risques sanitaires associés à leur exposition, il est d'intérêt de déterminer leur biodistribution, c'est-à-dire leur devenir au sein de l'organisme (en termes d'accumulation, de distribution, de métabolisme et d'élimination).

En particulier, les NPs de titane (TiO₂), actuellement produites en grandes quantités, sont majoritairement présentes dans les produits du quotidien (aliments, dentifrices, crèmes solaires, peintures, etc.). Elles sont ainsi à même de pénétrer dans l'organisme par différentes voies (par inhalation, par voie orale ou cutanée). Compte tenu de leur taille nanométrique, elles peuvent se resuspendre très facilement dans l'air, faisant de l'exposition par inhalation une voie d'entrée, non-intentionnelle, à surveiller en priorité. Dans l'organisme, cette propriété leur confère de plus la capacité de traverser la barrière pulmonaire, de se retrouver dans la circulation systémique et ainsi d'être distribuées à l'ensemble des organes et tissus.

De nombreuses études ont déjà été réalisées à ce sujet, cependant, peu se sont intéressées à évaluer la charge pulmonaire et le comportement des NPs dans les poumons, ainsi que leur biodistribution et leur clairance, pour relier ces mécanismes avec les effets toxiques et potentielles maladies pulmonaires qu'elles sont susceptibles d'induire.

Ce projet utilisera 450 rats mâles pour réaliser 3 procédures. La 1^{ère} consistera en l'évaluation de la charge pulmonaire résultant de l'inhalation de NPs de TiO₂, la 2^{ème} en l'étude de la biodistribution et de la toxicité de ces particules, et la 3^{ème} en l'étude de leur clairance.

Dans un 1^{er} temps, 3 concentrations et 4 temps d'exposition par inhalation seront testés pour mettre en évidence différents niveaux de charge pulmonaire de NPs de TiO₂. 96 animaux, sachant 6 animaux par modalité testée (un témoin négatif et 3 concentrations de TiO₂, et 4 durées

d'exposition), seront consacrés à ces essais. Dans un 2ème temps, sur la base de dosages de Ti dans les poumons, seront choisies 3 doses représentant des charges pulmonaires forte, moyenne et faible en NPs, pour évaluer la biodistribution des particules dans différents compartiments pulmonaires, ainsi que dans tout l'organisme, et leur toxicité. 144 animaux, sachant 24 animaux par modalité testée (un témoin négatif et un groupe exposé au TiO₂ aux concentrations et durées d'exposition retenues précédemment pour chacune des doses forte, moyenne et faible, et 4 types d'analyses, sachant 6 animaux par type d'analyse) seront consacrés à ces essais. Dans un 3ème et dernier temps, une dose sera retenue pour évaluer la clairance de ces particules au cours du temps. Pour cela, des dosages de Ti, des tests de toxicité et des analyses histologiques seront réalisés sur des échantillons prélevés post mortem. 192 animaux, sachant 24 animaux par modalité testée (un témoin négatif et un groupe exposé au TiO₂ à la dose retenue précédemment, 4 temps de sacrifice, et 4 types d'analyses, sachant 6 animaux par type d'analyse) seront utilisés pour ces essais.

Les animaux qui seront euthanasiés en fin d'étude seront anesthésiés par inhalation d'isoflurane, puis leur mort confirmée par exsanguination via la perfusion intracardiaque de tampon PBS. En cas d'atteinte de point limite nécessitant la mise à mort d'un animal en cours d'étude, une euthanasie par injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital sera pratiquée.

Au plan de la réduction, plusieurs paramètres biologiques seront évalués sur chaque animal, permettant ainsi de minimiser le nombre de rats utilisés. L'utilisation d'un modèle mathématique de prédiction de la charge pulmonaire en fonction de la concentration de NPs dans l'air et du temps d'exposition a également pour but de limiter les essais *in vivo*.

Concernant le raffinement, les conditions d'hébergement des animaux seront enrichies pour favoriser leur bien-être. Ils seront pour cela hébergés à 2 ou 3 animaux par cage pour leur socialisation. Un fond sonore musical sera diffusé la journée pour leur permettre de s'habituer au bruit généré par les manipulations et ainsi limiter le stress pouvant être ressenti durant les expérimentations. Des tunnels leur permettant de se cacher et de se familiariser avec le placement dans les tubes d'exposition par inhalation, du matériau leur permettant de nidifier et des bâtons en bois à ronger seront également disposés dans leurs cages d'hébergement pour favoriser leur développement cognitif. Un animal présentant une pathologie pouvant être soulagée recevra un traitement médicamenteux adapté.

Pour ce qui est du remplacement, les études cliniques et les méthodes alternatives à l'expérimentation animale, de par leurs limitations éthiques et techniques, ne peuvent pas répondre au questionnement concernant la charge pulmonaire, la biodistribution, la toxicité et la clairance des NPs de TiO₂ sur l'ensemble des paramètres qui seront analysés, nécessitant de fait le recours aux études *in vivo*.

11854 Les thérapies médicamenteuses conventionnelles exploitent les propriétés toxiques d'agents anticancéreux. Ils agissent principalement sur les cellules tumorales mais parfois sur les cellules saines, provoquant des effets secondaires responsables de l'arrêt des traitements chez les patients. Les protocoles de soin reposent sur des séquences d'administration de ces traitements chimiothérapeutiques à intervalle régulier. Cette fréquence est basée sur des données cliniques globales qui ont établi le meilleur ratio entre la fréquence d'injection, l'induction d'effets secondaires et l'efficacité thérapeutique anticancéreuse. Cependant, compte tenu de l'hétérogénéité des cancers et des réponses aux traitements chimiothérapeutiques, il serait intéressant de pouvoir adapter la fréquence des injections chimiothérapeutiques pour chaque patient.

Notre laboratoire a développé un système de détection ultra sensible et non invasif des tumeurs qui permet, grâce à l'analyse de marqueurs volatils présents dans l'air expiré des patients, de suivre la croissance des tumeurs. Dans le projet que nous déposons ici, nous souhaitons utiliser ce système pour optimiser les fréquences d'injection des traitements chimiothérapeutiques et étudier si, par ce biais, nous pourrions améliorer la qualité des traitements et réduire les effets secondaires de ces traitements. Pour mener à bien cette étude, nous réaliserons une seule procédure expérimentale pour un total de 48 souris.

L'action combinée d'un agent anticancéreux et d'un système de suivi de la croissance des tumeurs ne peut pas être abordée *in vitro*. Ces expériences nécessitent obligatoirement l'usage de modèles animaux. Comme mentionné plus haut, le système de détection des tumeurs par analyse de composés volatils a déjà été validé par notre laboratoire lors d'études préliminaires. Les données recueillies lors de nos précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales. Afin de pouvoir étudier notre stratégie thérapeutique chez des animaux, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives *in vitro* (remplacer). Par une approche statistique, la « Règle des 3R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation tout en assurant un nombre suffisant permettant une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences (réduire). Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées (groupe de 4 souris, nid, jouets, etc) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffiner). Afin de réduire le stress des animaux généré par les expérimentations, ces dernières seront réalisées sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Par ailleurs, en cas d'apparition de douleurs chez les animaux une administration d'analgésique (buprénorphine) sera réalisée.

11855 Projet :

Les glucocorticoïdes (GC) sont des hormones pléiotropes régulant à la fois le système immunitaire, la réponse au stress et le métabolisme énergétique. Notre groupe s'intéresse au rôle joué par les GC sur les cellules bêta pancréatiques, contenues dans les îlots de Langerhans et dont la principale fonction est de sécréter l'insuline, seule hormone hypoglycémisante.

Nous avons pu montrer que suite à un traitement chronique aux GC (corticostérone), la masse de cellules bêta est fortement augmentée, et principalement par la formation de nouveaux îlots. Nous avons également pu montrer que les effets des GC sur le pancréas sont indirects, et qu'un facteur circulant, présent dans le sérum des souris traitées aux GC, peut agir sur la formation de nouveaux îlots. Nous pensons que suite au traitement par les GC, les organes cibles des GC comme le muscle ou le foie vont produire un signal ou des signaux qui vont agir sur le pancréas pour favoriser la formation de nouveaux îlots.

L'objectif du présent projet est de caractériser l'adaptation pancréatique en réponse au traitement aux GC chez des souris dont le gène codant le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) a été invalidé dans le muscle ou le foie.

Type d'animaux : Modèles murins d'invalidation du récepteur GR des GC spécifiquement dans le muscle ou le foie de façon inductible.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 384 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Notre projet vise à définir les conséquences de la modification de la signalisation des glucocorticoïdes dans les tissus périphériques sur la communication inter-organe avec le pancréas. C'est un travail de physiologie intégrée qui permettra de comprendre les communications inter-organes et les régulations métaboliques entre les cellules qui produisent l'insuline et celles qui y répondent. La pierre angulaire de ce projet étant l'utilisation de souris invalidées pour le gène du GR, il ne nous est pas possible de remplacer ces animaux. Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement du projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

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

données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable des résultats et dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. De plus, les animaux seront observés quotidiennement avec et un suivi pondéral sera réalisé afin de déceler une perte de poids, qui serait signe d'une souffrance de l'animal.

11856 Contexte

Selon l'OMS, le cancer représente la seconde cause majeure de mortalité en France, avec 9 millions de décès recensés en 2015. Lors de cette pathologie, la formation de métastase est un processus long se déroulant en plusieurs étapes, avec 1) l'invasion des cellules tumorales à travers le tissu d'origine, 2) la dissémination dans la circulation sanguine, 3) l'adhérence à la paroi des vaisseaux et 4) l'extravasation de la voie sanguine à un site secondaire. Les étapes 2, 3 et 4 se déroulent en présence des composés du sang, comme les plaquettes sanguines par exemple. Ces dernières ont un rôle majeur dans l'hémostase primaire mais ont également été décrites pour participer à la dissémination métastatique.

Objectif

S'il a été proposé que cibler les plaquettes pourrait permettre d'inhiber la métastase, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas clairement identifiés. Mieux comprendre ces mécanismes est clef pour développer de nouvelles stratégies anti-cancéreuses. Notre étude s'intéresse à l'interaction physique et fonctionnelle existante entre les cellules tumorales et les plaquettes sanguines dans la circulation.

Méthodologie

Pour cela nous utiliserons une approche basée sur la visualisation en temps réel entre les plaquettes et les cellules tumorales au niveau du tissu pulmonaire. Cette visualisation repose sur l'utilisation de microscopie intravitale adaptée au petit animal. Des cellules tumorales seront inoculées aux animaux et leurs interactions avec les plaquettes pourront être visualisées au niveau des poumons par imagerie bi-photonique intra-vitale.

Effectifs et Statistique

Les animaux utilisés seront des animaux présentant ou non des récepteurs d'intérêts plaquettaires. Les cellules tumorales seront issues de 3 lignées différentes, dont la lignée B16F10, très bien référencée dans la littérature. Les lignées seront utilisées de manière séquentielle en fonction des résultats obtenus. Les effectifs utilisés pour nos expériences seront adaptés à la réalisation d'une analyse de variance via un test Kruskal-Wallis puis à un post-test Dunn.

Remplacement

Le but de ce projet est d'étudier en temps réel l'importance de l'interaction plaquettes/cellules tumorales dans un organe vivant chez l'animal. Des premiers tests *in vitro* ont été réalisés au laboratoire, permettant de confirmer l'importance des plaquettes sanguines dans la dissémination métastatique. Ces données sont issues de test *ex vivo* et ne permettent pas de comprendre intégralement le déroulement du processus. Une observation en temps réel au sein de l'organe hôte permettra d'apporter des réponses complémentaires aux premiers résultats obtenus. Ces études nécessitent l'utilisation d'animaux vivants pour s'approcher au plus près des phénomènes *in vivo* et ne peuvent être modélisés par des techniques *in vitro*.

Réduction

Pour les étapes de mise au point de notre procédure, nous valoriserons des animaux nés dans notre animalerie qui ne peuvent pas être utilisés dans d'autres projets car nés avec un génotype non souhaité. De plus, l'utilisation d'un objectif de faible grossissement permettra l'observation d'un

champ large, ainsi qu'un grand nombre d'événement sur le même animal. Les effectifs utilisés pour nos expériences seront adaptés à la réalisation d'une analyse de variance via un test Kruskal-Wallis puis à un post-test Dunn.

Raffinement Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet : • Hébergement dans des cages munies de particules de bois et enrichie avec un carré en coton compressé afin de permettre aux animaux de réaliser un nid conformément à leurs besoins comportementaux • Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C afin lutter contre l'hypothermie pendant la chirurgie. • Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée de l'opération. • Injection d'analgésique pendant chaque procédure. Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont pris en charge par du personnel compétant et entraîné.

Nombre d'animaux

Cette étude nécessitera au maximum l'utilisation de 250 souris.

11857 Avec plus de 800 membres connus chez l'Homme, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la plus large famille de protéines membranaires. Après la fixation d'un ligand, les RCPG permettent d'adapter notre métabolisme cellulaire à l'environnement extérieur et intérieur. Exprimés de façon ubiquiste, les RCPG sont impliqués dans une grande diversité de processus physiologiques et physiopathologiques, ce qui explique en partie, que près d'un tiers des traitements utilisés ciblent ces récepteurs. La présence élevée et anormale de différents RCPG a été observée dans plusieurs types de tumeurs, avec souvent une corrélation positive avec l'agressivité de ces tumeurs. A titre d'exemple, de hauts niveaux d'expression de certains RCPG ont été retrouvés dans les cancers du sein, du foie, des poumons, du côlon, de la tête et du cou, de la prostate ou encore du pancréas. Depuis plusieurs années, ces caractéristiques ont été mises à profit pour développer des radioligands, i.e. des molécules radioactives, pour cibler les RCPG surexprimés dans les tumeurs, à des fins diagnostiques voire thérapeutiques.

Acteurs majeurs des processus de développement des tumeurs, les peptides vasoactifs et leurs récepteurs constituent des cibles à fort potentiel pour développer ce type de radioligands. Parmi ces peptides, l'urotensine II (UII), qui présente des homologies structurales avec la somatostatine, interagit avec un RCPG nommé UT. Des études menées au sein de notre équipe ont montré que l'UT est surexprimé dans les gliomes et impliqué dans leur développement. Ces résultats sont cohérents avec ceux publiés par d'autres groupes de recherche, montrant d'une part que des niveaux d'expression anormaux de l'UII et l'UT ont été retrouvés dans des lésions précancéreuses hépatiques et colorectales, et d'autre part que le système urotensinergique serait impliqué dans la prolifération des cellules tumorales dans plusieurs cancers. Enfin, l'internalisation du récepteur UT, mécanisme indispensable pour le développement d'un radioligand à visée diagnostique et/ou thérapeutique a également été démontré après traitement avec l'UII.

Sur la base de ces données, nous avons cherché à développer des ligands urotensinergiques couplés au DOTA (un groupement capable de fixer les éléments radioactifs) à visée diagnostique grâce au marquage à l'indium (émetteur de photons gammas), ou à visée thérapeutique grâce au marquage à l'yttrium (émetteur de positons beta). Pour mener à bien ce projet, nous avons choisi d'utiliser d'une part l'UII, ligand naturel de l'UT, et d'autre part l'urantide, un ligand biaisé de l'UT. Pour cela, 104 animaux par radioligands, divisés en 13 groupes de 8 (1 groupe correspondant à une lignée cellulaire tumorale) recevront des greffes de cellules tumorales au niveau du flanc droit sous anesthésie générale afin d'analyser la cinétique du développement tumoral et la capacité des radioligands à cibler les tumeurs par imagerie SPECT (étude 1, procédure 1 et 2). Ensuite, 384 souris C57BL/6J (96 WT, 96 KO, 96 KO/KIn, subdivisés en 4 sous-groupes (euthanasie à 4h, 24h, 48h et 72h post-injection) de 8 animaux sur lesquels vont être testés 4 radioligands) seront utilisées pour l'analyse de la biodistribution et de la pharmacocinétique des différents radioligands (étude 2, procédure 3). Pour terminer, 1664 souris Swiss nude au maximum (32 animaux dans 13 groupes maximum, chaque groupe étant subdivisé en 4 sous-groupes (euthanasie à 4h, 24h, 48h et 72h post-injection) de 8 animaux sur lesquels vont être testés 4 radioligands) seront utilisées pour

l'analyse de la biodistribution des différents radioligands en présence de tumeurs (étude 3, procédure 4 et 5), ce qui porte le nombre total maximum d'animaux utilisés à 2464.

Remplacement : après avoir réalisé toutes les expériences permettant de caractériser les propriétés *in vitro* de ces deux nouveaux analogues avec des résultats très encourageants, nous nous proposons de déterminer si le DOTA-urotensine II et le DOTA-urantide peuvent permettre le diagnostic et/ou le traitement de tumeurs solides surexprimant le récepteur UT.

Réduction : nous souhaitons étudier les propriétés pharmacologiques de ces quatre radioligands chez les souris C57BL/6J non porteuses de tumeur et chez les souris Swiss nude porteuses de xénogreffes tumorales hétérotopiques. Il s'agit de connaître la biodistribution et la clairance, i.e. la répartition de la radioactivité au cours du temps au sein des différents organes, et le temps minimum que mettra l'organisme pour évacuer le radioligand par le métabolisme hépatique et rénal. Les procédures 1, 2 et 3 permettront de sélectionner les lignées tumorales et le temps optimal pour notre projet afin de réduire drastiquement le nombre d'animaux nécessaires pour la procédure 4 et 5. Par ailleurs, les animaux utilisés pour la procédure 1 serviront pour la procédure 2 et les animaux utilisés pour la procédure 4 serviront pour la procédure 5.

Amélioration : tout sera fait pour le bien-être des animaux, des conditions d'hébergement aux méthodes d'euthanasie, en accord avec les recommandations actuelles.

11858 Ce projet a comme objectif le développement d'anticorps monoclonaux destinés à rentrer dans la composition de trousse diagnostique utilisées en santé humaine.

Les anticorps monoclonaux, que l'on peut produire *in-vitro*, permettent d'éviter le recours à des anticorps polyclonaux dont l'obtention nécessite l'utilisation régulière d'un nombre important d'animaux.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux, plutôt que polyclonaux, s'inscrit dans la démarche de « Réduction » qui consistant à limiter au maximum le nombre d'animaux à utiliser.

Ces anticorps monoclonaux sont obtenus en immunisant des animaux avec la molécule contre laquelle on souhaite développer des anticorps monoclonaux.

La souris sera la seule espèce animale utilisée pour ce projet. La souris est l'animal de référence pour le développement d'anticorps monoclonaux et son utilisation est abondamment documentée. De plus, la souris est suffisamment éloignée phylogénétiquement de l'homme pour permettre l'obtention d'anticorps dirigés contre des protéines humaines.

Sur la base de l'activité de notre laboratoire pour ces cinq dernières années, le nombre d'animaux utilisés chaque année est d'une centaine. Le nombre total d'animaux qui pourront être utilisés pendant les cinq années de ce projet est d'environ cinq cents souris.

Ce projet s'est attaché au respect du principe des « 3R » :

Remplacement : L'état actuel de nos connaissances ne permet malheureusement pas de développer des anticorps monoclonaux performants sans l'utilisation d'animaux. En revanche, les Souris ne sont utilisées que dans les phases initiales de la création des hybridomes (cellules productrices d'anticorps). Par la suite, toute la production est faite par culture cellulaire, ce qui représente une énorme réduction du nombre de souris par rapport aux techniques précédentes.

Réduction du nombre d'animaux : Pour chaque nouveau projet, nous utilisons le nombre minimum d'animaux nous permettant de nous affranchir au mieux de la variabilité biologique observée entre les animaux vis-à-vis d'un même antigène.

Raffinement : L'injection des antigènes est réalisée par des voies parentérales, en utilisant des adjuvants choisis pour augmenter l'efficacité de l'immunisation. Il est possible d'observer une irritation locale pour les voies sous-cutanées ou intra-dermiques. Pour la voie intra-péritonéale, il arrive qu'une ascite se mette en place. Dans tous les cas, les animaux sont suivis tous les jours. Les irritations sont soignées, et en cas d'ascite, l'animal est euthanasié avant que le volume de liquide abdominal n'augmente et ne provoque de gêne.

Optimisation du protocole et des conditions d'hébergement des animaux : Dans ce projet, aucune douleur ou souffrance n'est attendue. Cependant en cas d'apparition d'une réaction délétère, les

injections seront arrêtées et si l'état de l'animal se dégrade, l'animal sera euthanasié. Les prélèvements sanguins seront réalisés sur des animaux anesthésiés et ayant reçu un traitement analgésique local. Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissement adaptés au milieu sont mis en place (tunnels en PVC, buchettes à ronger, coton de nidification...).

11859 Le lupus systémique érythémateux (LES) est une pathologie auto-immune rare efficace pour traiter la maladie de Pompe (MP).

La MP est une maladie génétique héréditaire rare due à l'altération du gène GAA qui produit la protéine acide alpha-glucosidase (GAA). Cette protéine est localisée au niveau de tous les tissus et convertit le glycogène en glucose. Le déficit de GAA provoque l'accumulation de glycogène conduisant à des lésions musculaires.

La MP provoque une faiblesse musculaire progressive et des difficultés respiratoires. Plus la maladie apparaît tôt, plus elle est sévère. On distingue la forme infantile sévère du nourrisson (avant l'âge de six mois) ainsi que des formes tardives de l'enfant et de l'adolescent (forme tardive juvénile) et de l'adulte (forme tardive adulte).

A ce jour, le seul traitement disponible pour la MP est une enzymothérapie substitutive, qui consiste hebdomadairement, à perfuser par voie intraveineuse la protéine GAA synthétique. Ce traitement fréquent améliore seulement certains facteurs de la MP (comme la cardiomyopathie), mais il est inefficace pour cibler les muscles respiratoires et squelettiques, ce qui ne permet pas de limiter la progression de la maladie.

Sur cette base, l'objectif de ce projet est de développer une stratégie de traitement de la MP par une approche de thérapie génique, basée sur l'utilisation de virus adéno-associés (AAV), qui ont montré qu'ils pouvaient, après une seule administration, corriger de manière stable des maladies où d'autres protéines sont manquantes.

Dans notre étude, nous testerons différents virus AAV modifiés pour apporter le gène manquant de la protéine GAA (AAV-GAA).

Afin de limiter au maximum l'utilisation d'animaux pour ce projet, 60 de nos AAV-GAA ont préalablement été testés sur des cellules cultivées en laboratoire (Remplacement). Ceci nous a permis de sélectionner 28 de nos meilleurs AAV-GAA.

La capacité de nos virus à guérir la MP et à franchir les défenses immunitaires ne peut être démontrée complètement que dans un organisme physiologique "entier".

Pour évaluer l'efficacité thérapeutique de nos virus nous devons utiliser le modèle souris de la MP qui ne possède pas la protéine GAA et qui mime la maladie humaine [B6 ; 129-Gaam1Rabn/J (GAA^{-/-})].

Toutefois, la seule utilisation de cette souche pose certains inconvénients. En effet, pour répondre à l'ensemble des questions posées, le nombre de souris GAA^{-/-} en élevage serait trop important. Ainsi, dans l'optique de réduire au maximum l'utilisation des souris GAA^{-/-}, nous testerons dans un premier temps nos AAV-GAA chez une souche de souris saines (C57Bl/6). Ceci nous permettra de sélectionner ceux capables de produire le plus efficacement la protéine GAA dans un organisme entier. Puis dans un second temps, les traitements sélectionnés (14) seront testés chez les souris GAA^{-/-}, afin de valider leur pouvoir thérapeutique de nos AAV-GAA.

Au total, 630 souris (290 C57Bl/6 et 340 GAA^{-/-}) seront utilisées. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études et en fonction d'une analyse statistique, afin d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible.

Raffinement : Nous allons utiliser des procédures de raffinement pour éviter la souffrance des souris lors du prélèvement sanguin et pendant l'injection du vecteur thérapeutique. Les prélèvements de sang seront effectués à la veine mandibulaire car le volume de sang prélevé est réduit et la zone de prélèvement est moins sensible. On appliquera une compresse au niveau du point de prélèvement afin de stopper l'éventuel saignement.

11860 L'expression d'enzymes du métabolisme des acides aminés au niveau du microenvironnement tumoral est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer. Notre projet consiste à identifier quelles cellules expriment l'une de ces enzymes et à mieux comprendre comment celle-ci favorise la dissémination métastatique dans un modèle de mélanome uvéal primaire qui métastase aux niveaux de la peau et des ganglions, puis à distance au niveau pulmonaire. Aucun outil dans le commerce ne permet de détecter spécifiquement l'enzyme que nous étudions. Notre projet requiert donc la création d'une nouvelle lignée de souris à phénotype dommageable, puisqu'elle exprime une forme fluorescente de l'enzyme et développe spontanément un cancer métastatique. Dans le nouveau modèle, nous étudierons le niveau d'expression de l'enzyme au cours du développement tumoral. Nous déterminerons comment l'inactivation de l'enzyme à des temps définis, précoces ou tardifs, affecte l'évolution tumorale et identifierons quelles cellules exprimant l'enzyme contribuent à la progression tumorale. Cette étude de régulation de l'expression de l'enzyme au cours du développement tumoral ne peut être atteinte par des techniques de « remplacement » *in vitro*, mais elle sera complétée par l'évaluation de l'induction de l'enzyme sur des cellules de souris *in vitro* exprimant l'enzyme fluorescente cultivées en présence de différentes cellules isolées de tumeurs primaires ou de métastases. Cette étude nécessitera l'utilisation de souris sauvages et génétiquement modifiées.

L'enzyme qui nous intéresse présente une activité bactéricide. Nous émettons l'hypothèse que son expression accrue au cours du développement tumoral favorise l'accumulation de bactéries aux niveaux intestinal et tumoral contribuant à la progression tumorale. Nous traiterons des souris exprimant ou non l'enzyme par antibiothérapie afin de déterminer l'impact des bactéries sur la cinétique et l'incidence tumorale.

Bien que la maladie progresse très différemment d'une souris à l'autre, les données bibliographiques permettent de réduire au maximum le nombre de souris nécessaires pour l'étude. En terme de « réduction », nous utiliserons des lots d'animaux les plus restreints possibles mais suffisants pour obtenir des données statistiques fiables. Chaque souris sera diagnostiquée de façon hebdomadaire. Les animaux de 3 à 24 semaines seront mis à mort pour une analyse post-mortem des cellules infiltrant la tumeur primaire et les métastases. L'administration d'antalgiques n'étant pas compatible avec notre étude scientifique, des points limites ont été définis et permettront de mettre à mort l'animal de façon anticipée en cas de souffrance.

Le nombre total d'animaux est estimé à 1548 pour l'ensemble du projet qui se déroulera sur cinq ans. Nos résultats récents suggèrent que l'enzyme que nous étudions pourrait être une cible importante dans le traitement du cancer. Ce projet permettra d'élucider ses mécanismes d'action dans le contexte tumoral.

11861 Chez les mammifères, les noyaux suprachiasmatiques (NSC) constituent l'horloge biologique principale et sont responsables des rythmes biologiques circadiens. Cette horloge est synchronisée au cycle lumière-obscurité (LD). Les fonctions qu'elle régule peuvent être altérées par des perturbations du cycle LD (ex. travail posté, décalage horaire). De récents travaux chez l'Homme montrent un lien entre le jetlag social (c'est-à-dire le décalage chaque week-end du rythme veille-sommeil) et différents troubles métaboliques et comportementaux. Le but du projet est d'étudier chez le rongeur l'impact physiologique et comportemental du décalage hebdomadaire du cycle veille-sommeil et de comprendre les mécanismes moléculaires et neuronaux sous-jacents.

Pour cela, nous utiliserons deux types de rongeurs (308 souris C57BL6 qui sont nocturnes et 96 *Arvicanthis* qui sont diurnes). Dans une première partie, des animaux seront soumis à un rythme de veille-sommeil qui sera retardé de trois heures chaque week-end afin de reproduire les horaires de veille-sommeil observés chez l'Homme. Afin d'étudier les impacts de ce décalage chronique sur ces animaux, nous étudierons s'ils consomment plus de nourriture calorique et appétissante, et s'ils prennent plus de poids. Nous évaluerons chez la souris les comportements de type anxieux et dépressifs. Nous étudierons aussi chez ces dernières le système dopaminergique, en lien avec le système de la récompense. Chez un autre groupe de souris, nous étudierons l'impact du décalage sur le sommeil par électrocorticographie.

D'autre part, et toujours chez la souris, nous souhaitons étudier si une perturbation spécifique de la transmission du NSC (par une approche virale et pharmacologique) des souris reproduit les effets observés avec le décalage hebdomadaire du cycle LD. Ce projet aura une durée de 4 années. Le nombre d'animaux a été choisi pour permettre une significativité statistique des résultats avec un minimum d'animaux. De plus, ces derniers sont réutilisés pour différentes procédures dès que possible (toujours en accord avec l'avis du vétérinaire et du porteur de projet ; Réduire). Les procédures d'études pharmacologiques seront précédées de test ex-vivo afin de vérifier l'efficacité des molécules avant de passer in-vivo dans un système intégré (Remplacer). RAFFINER : Enfin, l'enrichissement des cages d'hébergement (ouate et baton à ronger) aura pour but de limiter le stress. Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie et analgésie et la température corporelle sera maintenue à l'aide d'un tapis chauffant thermostaté. Le suivi post-opératoire des animaux sera réalisé à l'aide d'une grille de scoring de la douleur et des critères d'interruption des procédures (points limites) ont été parfaitement définis.

11862 Notre équipe s'intéresse à une protéine connue depuis longtemps pour provoquer le cancer : la protéine Bcl-xL. Nous avons montré qu'une modification particulière de cette protéine affaiblit son potentiel cancéreux. Nous avons réalisé *in vitro* (sur des cellules en culture) de nombreux tests pour parvenir à cette conclusion. L'objectif de notre équipe est de savoir pourquoi et comment les cellules qui expriment cette protéine modifiée perdent leur potentiel cancéreux.

Répondre à cette question nous permettra de révéler de nouvelles voies pour limiter le cancer.

Un des tests que nous avons menés sur les cellules en culture indique que lorsque Bcl-xL est modifiée, les cellules activent un programme cellulaire connu pour les protéger contre le stress. Ce programme s'appelle l'autophagie. Le prix Nobel de médecine a été attribué en 2016 à un chercheur pour ses travaux sur l'autophagie, parce que c'est une découverte majeure pour la santé publique. Mais dans des cellules cancéreuses, l'autophagie peut être une arme à double tranchant, parce qu'elle peut aussi aider les cellules malades à résister contre un stress comme celui induit par la chimiothérapie ou la radiothérapie.

Nous devons donc déterminer si l'autophagie, activée par les cellules où Bcl-xL est modifiée, protège contre le cancer ou accélère la cancérisation. Nous avons, pour cela, modifié le patrimoine génétique de cellules de cancer du côlon en enlevant, par une technique de génie génétique, 2 gènes connus pour contrôler l'autophagie et en introduisant, dans ces mêmes cellules, des versions modifiées de BCL-xL. La comparaison de la croissance de tumeurs formées par ces cellules au patrimoine génétique modifié, avec les cellules ne portant pas ces modifications génétiques, nous permettra de répondre à la question posée.

Ce projet repose, en effet, sur l'utilisation de modèles de tumeurs humaines greffées sur des souris. Ces modèles, basés sur des xénogreffes où le donneur et le receveur appartiennent à des espèces différentes, sont actuellement les seuls permettant de reconstituer sur animal la complexité des tumeurs humaines. Ainsi, les résultats obtenus permettront une réelle extrapolation de l'animal à l'homme.

Tout au long de ce projet nous respecterons la règle des « 3 R ».

1/ Réduction : Le projet, dont la durée sera de 2 années, inclura une étude "pilote" visant à caractériser et optimiser les paramètres de croissance tumorale dans le but de restreindre le nombre d'animaux. Les études comprendront un maximum de 500 animaux. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études et surtout en fonction d'une analyse statistique dans le but d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible. Ce nombre pourra être revu à la baisse en fonction des résultats de l'étude pilote et dès que les résultats seront significatifs. Les protocoles combineront un ensemble de procédures permettant de faire un suivi et d'obtenir plusieurs informations chez la même souris.

2/ Raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leurs morts. A ce titre, l'environnement des animaux sera enrichi, les injections de cellules se feront sous anesthésie générale, les animaux seront à 5 par cages pour respecter les groupes sociaux et seront

surveillés quotidiennement. Des points limites précoces ont été prévus pour sortir les animaux de l'étude en cas de souffrance avérée.

3/ Remplacement : Il n'existe malheureusement actuellement pas d'alternative validée à ces méthodes *in vivo*, mais nous avons réalisé en amont tous les tests *in vitro* et *ex vivo* possibles qui montrent le grand intérêt de cette étude à des fins médicales. Il est indispensable maintenant de vérifier cela dans un environnement complexe qu'est l'organisme.

11863 Des diarrhées sont très souvent observées chez le jeune mammifère et en particulier chez les veaux d'élevage laitier, principalement de la naissance au sevrage. Elles représentent la seconde cause de mortalité des veaux, après la mortalité au vêlage. Ces diarrhées s'accompagnent souvent de retards de croissance qui peuvent être irréversibles, pénalisant ainsi le bon développement de l'animal et l'expression de son potentiel de production à l'âge adulte. Dans le contexte actuel de lutte contre l'antibiorésistance, des moyens de prévention permettant de diminuer le recours aux antibiotiques devraient émerger pour préserver la santé animale et humaine. A ce jour, la compréhension de la mise en place du microbiote digestif chez le jeune veau laitier et des facteurs pouvant la moduler constitue une voie d'identification de leviers pour prévenir l'apparition de ces diarrhées. Parmi les facteurs externes de modulation du microbiote digestif, on retrouve des facteurs alimentaires comme l'addition de levures vivantes (levure probiotique) ou d'extraits de levures. L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet d'une supplémentation en extraits de levure sur la mise en place du microbiote digestif et le statut immunitaire du veau laitier. Cette étude est réalisée dans une station expérimentale, où 20 veaux femelles sont répartis en 2 lots : un lot témoin (sans apport de fractions de levure) et un lot traité (recevant des fractions de levure). Les animaux sont élevés dans des conditions d'élevage conventionnel dans des cases individuelles jusqu'à l'âge de 8 semaines (en accord avec la directive européenne 2008/119/CE). Les veaux sont suivis de la naissance au sevrage (8 semaines) et reçoivent une alimentation à base d'aliment d'allaitement, de foin et d'un aliment concentré riche en céréales et en protéagineux. Ils sont pesés une fois par semaine. Des prélèvements de contenu ruminal et de contenu fécal dédiés à l'analyse du microbiote digestif sont réalisés à 3, 10, 30 et 60 jours après la naissance. A ces mêmes dates, des analyses complémentaires sur les fèces sont réalisées afin d'estimer l'état des selles des veaux (mesure de la teneur en matière sèche) et d'identifier les pathogènes potentiellement présents (bactéries, virus et parasites). Des prises de sang sont également réalisées à ces dates afin de suivre le statut immunitaire de chaque veau.

L'étude du microbiote digestif devrait permettre de comprendre l'action des fractions de levure sur la mise en place du microbiote digestif et de trouver, à terme, des solutions nutritionnelles destinées aux jeunes veaux pour favoriser la mise en place d'un microbiote digestif induisant une plus grande résistance du jeune aux diarrhées.

L'étude de la réponse de l'hôte à un apport de fractions de levure dans son alimentation implique l'utilisation d'animaux. Aucune mise à mort n'est prévue dans cet essai. Après le sevrage (fin de l'essai), les veaux femelles intégreront directement un élevage.

Aucune souffrance n'est infligée aux veaux. Ils sont élevés dans des conditions d'élevage conventionnelles. Le nombre d'animaux prélevés est limité à 10 veaux par lot, permettant de mettre en évidence l'existence ou non d'une modulation du microbiote digestif par l'ajout de fractions de levure à l'alimentation du jeune.

Une observation générale biquotidienne du comportement des veaux ainsi que de leur consommation d'eau et d'aliments permettra de s'assurer du bon déroulement du projet.

11864 Le projet s'inscrit dans l'étude des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, et plus particulièrement la maladie de Crohn. La maladie de Crohn touche plus de 1 million de personnes en Europe. C'est une maladie digestive particulièrement invalidante pour les personnes atteintes. A ce jour aucun traitement curatif n'existe. L'enjeu de ce travail de recherche appliquée est de pouvoir proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter les patients.

Afin de réaliser ces études, nous avons recours à un modèle de souris portant un gène humain (souris transgéniques). Ceci permet aux bactéries isolées de patients de s'installer dans le tube digestif des animaux, mimant ainsi ce qui est observé chez les patients. Ce projet permettra d'étudier les mécanismes d'interaction entre les bactéries impliquées dans la maladie et l'intestin et de tester de nouvelles molécules prometteuses pour le traitement futur des patients atteints de maladie de Crohn. Ce projet de 3 ans vise à confirmer les résultats obtenus dans des modèles cellulaires, dans un modèle *in vivo* de façon à valider certaines molécules comme étant d'intéressantes cibles thérapeutiques dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Dans ce protocole expérimental, les souris recevront par voie intra-péritonéale des molécules pouvant potentiellement limiter la colonisation intestinale par les bactéries pathogènes. Ensuite, les souris recevront une faible dose d'antibiotiques et les bactéries pathogènes par voie orale (gavage). Le poids des souris sera suivi et les bactéries seront dénombrées dans les fèces quotidiennement. Lors de ce protocole, il est attendu que les animaux traités avec les molécules éliminent rapidement les bactéries. Au contraire, les animaux non traités devraient développer une inflammation intestinale légère à modérée associée à une diarrhée. Dans le cas où un bénéfice important des molécules testées serait observé ici, ceci représenterait un réel espoir de traitement pour les patients atteints de maladie de Crohn.

Remplacer

Ce projet nécessite l'utilisation de souris transgéniques afin de reproduire au mieux la physiopathologie de la maladie de Crohn dans un environnement complexe comprenant le système immunitaire et le microbiote intestinal. Dans ce contexte, les études sur cellules en culture ne sont pas suffisantes pour conclure sur le bénéfice apporté par les molécules testées.

Réduire

Le nombre de 8 animaux par lot a été défini (4 animaux par cage) en fonction des résultats obtenus lors de précédentes études sur le même modèle de souris colonisé avec cette souche de bactéries. Ce nombre d'animaux devrait permettre d'obtenir des résultats fiables, reproductibles et statistiquement significatifs. Nous réaliserons 6 lots de souris mâles avec 8 souris par lot (3 lots de souris transgéniques et 3 lots de souris sauvages) et 6 lots de souris femelles avec 8 souris par lot (3 lots de souris transgéniques et 3 lots de souris sauvages). Un lot ne recevra pas la molécule à tester, un lot recevra la molécule 1, un lot recevra la molécule 2 à tester. Les 3 lots seront infectés par les bactéries.

Le nombre d'animaux utilisé pour cette manipulation a été réduit au minimum (96 animaux au total) dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet. Dans le cadre de la règle des 3R, un maximum de prélèvements sera réalisé sur les animaux utilisés.

Raffiner

Les animaux seront hébergés 4 par cages de 900cm² et auront libre accès à l'eau et la nourriture. Les conditions d'hébergement sont les suivantes : température 20-24°C, hygrométrie 50 plus ou moins 10%, cycle 12h/12h, éclairage 350/450 lux.

Un enrichissement est proposé aux souris : croquettes de litières condensées, maison en carton.

Une inflammation intestinale légère à modérée est attendue en réponse à l'infection bactérienne des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement pour l'évaluation de la souffrance. Les animaux qui rentrent dans les critères d'arrêt définis sont immédiatement euthanasiés pour limiter leur souffrance.

Si un animal remplit un de ces 3 critères (points limites) :

1/perte de poids > à 15%

2/immobilité, ou position recroquevillée, ou dos vouté, ou augmentation de la fréquence respiratoire/respiration pénible

3/signes cliniques d'inflammation intestinale (pelage et orifices souillés avec diarrhée et/ou présence de sang dans les fèces)

il sera immédiatement sorti du protocole et euthanasié.

En conclusion, la mise en place de ce protocole expérimental permettrait de montrer un potentiel bénéfique des molécules testées, dans un modèle approprié pour l'étude de la maladie de Crohn. Les échantillons qui seront prélevés le jour du sacrifice permettront par la suite de réaliser de nombreuses analyses permettant de comprendre le fonctionnement des molécules testées.

11865 Les complications respiratoires représentent une préoccupation majeure en termes de risque postopératoire. Ces complications sont majoritairement liées aux anesthésiques utilisés, dont les effets peuvent être potentialisées par la co-administration de substances analgésiques de type morphiniques.

Ces complications se manifestent dans la plupart des cas par des apnées plus ou moins nombreuses et de durée plus ou moins longues, pouvant aller dans le pire des cas jusqu'à l'arrêt respiratoire. L'objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel de nouvelles molécules à améliorer la fonction respiratoire sous anesthésie. Pour cela la respiration des animaux sera enregistrée.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 800 rats sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la fonction respiratoire. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le rat est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

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

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

- . la mise au point de procédures rigoureuses
- . la formation du personnel
- . le suivi des éventuels signes cliniques
- . la détermination des points limites
- . le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire
- . suivi des animaux pendant toute la phase d'anesthésie et de réveil et une prise en charge si nécessaire.

11866 Une tumeur est un terme générique qui correspond au développement d'un amas de cellules au sein d'un tissu normal. Les tumeurs peuvent être bénignes ou au contraire malignes aboutissant à la pathologie cancéreuse. A la base de ce développement anormal, une cellule : la cellule cancéreuse. Elle possède des caractéristiques particulières permettant à la tumeur de grossir. Cependant toutes les cellules cancéreuses ne donnent pas des cancers menaçant l'organisme. Le système immunitaire du corps dispose de cellules dites « tueuses », capables de détecter les cellules anormales et de les éliminer.

Le but de ce projet est donc d'étudier et de comprendre le rôle des cellules T régulatrices et des voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte lors du développement de tumeur chez la souris. Un modèle murin de greffe de tumeur permet d'étudier la pathologie, de comprendre les mécanismes sous-jacents et d'étudier les potentielles approches thérapeutiques. Ces cellules participent à la tolérance immunitaire en régulant par divers mécanismes (sécrétion de cytokines, cytolysse ou expression de molécules inhibitrices) l'action immunosuppressive des lymphocytes T effecteurs. La compréhension de ces mécanismes permettra par la suite l'élaboration et l'étude de nouvelles pistes thérapeutiques.

Dans un premier temps, plusieurs modèles de développement de tumeurs chez la souris seront mis en place afin d'étudier les mécanismes immunitaires (Partie 1). Des cellules tumorales seront injectées par voie sous-cutanée à l'animal, à raison de 3×10^5 cellules par animal. 10 jours après l'injection de cellules tumorales, les souris vont ensuite être déplétées en cellules T grâce à une injection quotidienne de toxine diphtérique et l'évolution de la tumeur sera suivie pendant 15 jours. Les animaux seront mis à mort au bout de 25 jours pour analyser différents paramètres immunologiques et histologique. Ceci permettra d'étudier la réponse immunologique lors du développement d'une tumeur et le rôle des cellules T régulatrices sur le développement de la maladie (signes cliniques) et de l'inflammation.

Dans un second temps, le modèle mis en place sera proposé au client correspondant à la phase préclinique dans le développement de médicaments à visée thérapeutique (Partie 2). Cette étape permettra l'étude de l'action des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur. Ce projet aura pour but final de tester de nouveaux médicaments anti-tumoraux.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/CRJ. L'administration des cellules tumorales à l'animal se fait par voie sous-cutanée sous anesthésie générale afin de minimiser les situations douloureuses et stressantes.

Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles qui sont requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation va dépendre de la difficulté à mettre en place le modèle et du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 16 études, incluant au maximum 6 études à 45 animaux et 10 études à 90 animaux, soit 1170 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

11867 La neuropathie périphérique désigne l'ensemble des maladies des nerfs périphériques issus de la moelle épinière. Ces pathologies peuvent avoir des causes variées comme le diabète, la carence en vitamine, des phénomènes inflammatoires, les traitements anti-cancéreux ou des traumatismes. Au vu de l'incidence de ces pathologies et de leur impact sur la qualité de vie des patients de nombreuses recherches sont menées pour prévenir les neuropathies ou favoriser la réparation des nerfs périphériques.

Dans ce projet nous nous intéressons aux neuropathies induites par un traumatisme mécanique. Chez l'homme, ce phénomène se produit lors d'un accident qui provoque la section ou l'écrasement d'un nerf.

Afin de mimer ce qui se passe chez l'homme, l'écrasement du nerf sciatique chez la souris est un modèle largement utilisé pour décrire les processus de neurodégénérescence mis en œuvre mais aussi évaluer des moyens de favoriser la réparation nerveuse.

Dans ce projet nous utiliserons ce modèle d'écrasement du nerf sciatique pour évaluer l'effet de traitement qui améliore la récupération du nerf lésé. Nous utiliserons plusieurs tests pour évaluer l'état clinique des animaux afin de déterminer si les nouveaux traitements en cours de développement peuvent être bénéfique ou non pour les patients.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R,

Remplacement : aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. En effet, les processus étudiés impliquent des interactions multiples et complexes et ne peuvent pas être reproduits par des expérimentations *in-vitro*. Cependant les molécules testées dans ce projet ont fait l'objet d'une sélection sur des tests *in vitro* afin de choisir celles qui ont le plus fort potentiel dans l'indication thérapeutique testée.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesures sont mises en œuvre notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement adaptées (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté), une visite quotidienne, un traitement de la douleur lors de l'induction de la pathologie (traitement antalgique 30 minutes avant la chirurgie, le soir et le lendemain ; acte chirurgical sous anesthésie gazeuse) puis une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

Réduire : nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 10 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 1 000 souris est envisagée.

11868 Le microbiote intestinal joue un rôle primordial sur la maturation et la réponse du système immunitaire et la santé humaine. La souris et le rat sont utilisés comme modèle d'étude de son rôle chez l'Homme. La reconstitution de la flore intestinale de rats ou de souris stériles, en utilisant des bactéries trouvées naturellement chez l'Homme ou probiotiques est réalisée. Donc ce projet s'inscrit dans l'amélioration de la santé de patients atteints de pathologies avec un déséquilibre de la flore intestinale.

Le projet se déroulera en 3 parties :

1. Colonisation des souris gestantes par différentes souches d'E. coli probiotiques (6 souches et 1 contrôle) pour l'étude de la réponse intestinale et systémique aux jours 0, 7, 14, 21, 28, 35 et 56 après la naissance (5 souris/groupe soit 245 souris au total). Seules les mères seront colonisées afin d'observer la transmission de la souche aux petits.

2. Colonisation des souris contrôles de type sauvage C57Bl/6, ou de souris transgéniques invalidés pour les gènes de l'immunité : IL-22, IL-17Ra et IL-22xIL-17Ra, Rip2, Nod2. Ces animaux ne présentent pas de phénotype dommageable. Les animaux seront colonisés par des probiotiques (4 souches et 1 contrôle) pour étudier la production d'antimicrobiens intestinaux et la fonction de la barrière intestinale (10 souris/groupe répété 2 fois. Soit 600 souris au total). Le but de cette partie est d'identifier des souches probiotiques capables d'induire une réponse anti-microbienne par l'intermédiaire des voies immunitaires IL-17 et IL-22 de façon indépendante du récepteur de l'immunité Nod2 et de son adaptateur Rip2, ce qui pourra être confirmé grâce à l'utilisation des animaux déficients précédemment cités.

3. Colonisation ou non par une flore fécale humaine de rats de type sauvage F344 stériles ne présentant pas de phénotype dommageable. Différents éléments seront testés : le type de probiotique et le type de matrice (produit laitier fermenté) contenant les probiotiques (7 conditions expérimentales 10-14 rats/groupe soit 930 rats). Ces éléments permettront de déterminer le rôle de la barrière intestinale vis-à-vis des probiotiques testés.

Les probiotiques sont administrés aux souris et rats *per os*. La colonisation et le microbiote vont être analysés ainsi que la barrière intestinale et la réponse du système immunitaire intestinal.

L'objectif du projet est d'étudier les relations complexes entre le microbiote intestinal, le système immunitaire et les cellules structurales intestinales. Cette étude *in vivo* est indispensable pour ce

projet puisqu'il nécessite plusieurs niveaux de complexité qui ne peuvent être développés *in vitro* ou *in silico*. De plus la 3ème partie du projet permettra de confirmer des résultats obtenus *in vitro*.

Des groupes d'animaux entre 5 et 14 seront utilisés de façon à limiter le nombre de répétitions de chaque procédure expérimentale tout en ayant un nombre suffisant d'individus pour valider statistiquement les résultats obtenus.

Chaque procédure sera suivie quotidiennement pour s'assurer du bien-être des animaux. Si des animaux montrent des signes de souffrance (point limite : perte de poids supérieure ou égale à 20%), ils seront mis à mort.

11869 La peau constitue le plus grand organe du corps humain formant une barrière cutanée contre toute attaque pour protéger et maintenir l'intégrité de l'organisme. Suite à une agression ayant des origines diverses, la peau met en place un mécanisme de défense : l'inflammation.

Ce projet consiste tout d'abord à identifier les médiateurs exprimés lors de l'inflammation et leur source cellulaire. Ensuite, l'objectif est de modéliser l'effet de ces médiateurs *in vitro* sur des cellules qui recouvrent la peau les kératinocytes, *ex vivo* sur des cellules épithéliales primaires et *in vivo* chez la souris. L'intérêt du projet est l'étude des mécanismes de l'inflammation de la peau induite par irritation physique, mécanique, allergique ou chimique. La peau est constamment exposée à des traumatismes et irritants donc une étude mécanistique est importante pour comprendre ses moyens de défense. Ce projet s'inscrit dans la continuité d'un projet qui a déjà fait l'objet d'une évaluation pour le modèle plasma froid. D'autres modèles de lésion vont être étudiés pour comprendre au mieux les mécanismes d'inflammation.

Pour cette étude de la réponse inflammatoire cutanée quatre axes sont considérés :

1. Plasma froid, étude de sécurité et thérapeutique
2. Irritation mécanique : Lésion par tape pour étude de réparation.
3. Réaction aux allergènes : Exposition aux allergènes protéasique comme papain, l'ovalbumine ou l'extrait du champignon *Alternaria*
4. Réactions inflammatoires aux médicaments comme calcitriol et imiquimod

Les animaux vont être exposés une à cinq fois aux irritations cutanées puis mis à mort 24h après la dernière exposition. Des lésions peuvent apparaître au cours du traitement dans le cas d'études de la réparation de la peau. Afin de caractériser la réponse inflammatoire mise en place au cours du temps des dosages médiateurs, des analyses FACS et immunohistochimie pour l'identification des populations cellulaires impliquées dans cette réponse inflammatoire, des quantifications de l'expression des transcrits exprimés dans les biopsies cutanées quantitative et des analyses histologiques sur des biopsies cutanées de peaux non-lésionnelles et lésionnelles seront réalisés. Pour compléter l'analyse, d'autres modèles de souris transgéniques déficientes pour des médiateurs pro-inflammatoires telles que tumor necrosis factor, interférons et STING (stimulator of interferon gene) seront utilisées. Les lignées indiquées ne présentent pas d'immunodéficiência forte ; cependant les souris déficientes sont plus susceptibles aux pathogènes et sont maintenues dans un environnement avec un statut sanitaire de type EOPS (Exempt organismes pathogènes spécifiques).

Au-delà de la compréhension du rôle précis de ces médiateurs dans la réponse inflammatoire notre objectif est de déterminer de potentielles cibles thérapeutiques, sachant que la modulation de ces cytokines est aujourd'hui une approche très fine et efficace. Donc des nouveaux composés de type anti-inflammatoires seront testés.

Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur. Le projet représente un ensemble d'études types. Le projet pourra comporter jusqu'à 32 études, soit 1600 souris au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : Pour veiller au bien-être des animaux, des anesthésiques seront administrés aux animaux lors de traitements pour éviter la douleur. Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur et le stress au moment de l'expérimentation. Lors de cette observation, l'aspect de l'animal, son comportement et sa mobilité, la prise alimentaire ainsi que l'apparition d'effets néfastes des produits administrés sont observés. Un point limite adapté a été déterminé pour permettre l'arrêt ou l'administration d'analgésiques, tel que le paracétamol, si la douleur ou la détresse des animaux est importante.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

11870 L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la dystrophie myotonique de Steinert (DM1) afin de pouvoir développer et tester de nouvelles approches thérapeutiques. La DM1 touche 1 personne sur 8000 en France. C'est une maladie dominante caractérisée par une grande variabilité dans la nature et la sévérité des symptômes. Elle se caractérise par une faiblesse musculaire, un trouble du tonus musculaire, une cataracte précoce, des troubles cardiorespiratoires, une hypersomnolence, un hyperinsulinisme et des anomalies cognitives et du comportement. La forme la plus grave de la maladie se manifeste dès la naissance par une diminution du tonus musculaire, des problèmes respiratoires sévères et par un retard psychomoteur et un retard mental. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace de cette maladie.

Afin d'étudier cette maladie au cours du développement et dans différents tissus, nos collaborateurs ont développé un modèle de souris transgéniques porteuses du gène muté responsable de la DM1. Ces souris transgéniques reproduisent certaines caractéristiques de la maladie. Le but final de ce projet est d'étudier les mécanismes particuliers liés à la mutation, leurs conséquences physiopathologiques dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et physiologiques impliqués dans les anomalies du système nerveux. Notre participation s'organise plus particulièrement autour de l'impact de la mutation DM1 sur les interactions physiques et fonctionnelles entre les neurones et les astrocytes. En effet, l'analyse du cerveau de ces souris a montré une toxicité plus prononcée dans les astrocytes par rapport aux neurones. Cette observation a des répercussions importantes pour la neurobiologie de la DM1 et la conception des nouvelles thérapies.

Au total nous utiliserons un maximum de 60 souris adultes. Ce nombre a été déterminé en fonction des tests statistiques que nous utiliserons. Les animaux seront hébergés tout au long de l'étude dans des cages enrichies à l'aide de coton pour faire leurs nids. Afin de réduire la souffrance et le stress des animaux, des points limites ont été établis et un suivi du bien-être des animaux sera réalisé régulièrement. Seule l'utilisation de modèles animaux comme la souris nous permet d'étudier les mécanismes à l'origine de la pathologie au sein de structures corticales fonctionnelles.

11871 La myxomatose (MYX) est une maladie majeure du lapin européen due au virus myxomateux. C'est une maladie encore très présente en France et à l'étranger, tant sur le lapin de garenne que sur les lapins d'élevage. Les pertes causées par cette maladie sont généralement très lourdes.

Il n'existe aucun traitement contre la myxomatose. La vaccination est la seule façon efficace de protéger un élevage, ou un lapin, contre la myxomatose. Deux formes de la maladie ont été décrites chez le lapin européen :

- la forme nodulaire (ou classique) : apparition de nodules (myxomes) sur les paupières, oreilles, parties génitales., abattement.

- forme respiratoire : suppuration des voies respiratoires, inflammation de la paupière, myxomes très réduits, abattement.

La maladie hémorragique virale (VHD ou viral hemorrhagic disease) dans sa forme classique a émergé en 1984 en Chine et est apparue en France durant l'été 1988. Il s'agit d'une hépatite virale du lapin sauvage ou domestique. La maladie est généralement septicémique et touche surtout des lapins adultes ou préadultes. La VHD est enzootique dans les populations de lapins sauvages d'Europe.

Il n'existe aucun traitement contre cette affection. Chez des lapins non vaccinés, cette hépatite virale dans sa forme classique (VHD-C) est habituellement responsable de 30 à 90 % de mortalité en région d'épizootie. Après une incubation de 2 à 5 jours, le lapin meurt.

Depuis 2010, un nouveau variant (nommé VHD variant 2010) formant un nouveau groupe génétiquement distant est apparu. Les mortalités enregistrées dans les élevages touchés par la VHD variant (VHD-V) varient entre 10 et 30%.

Dans les 2 formes de VHD la mort est parfois précédé de quelques signes cliniques : difficulté respiratoire, raideur des pattes postérieures, sang autour des narines ou de l'anus.

A ce jour il existe des vaccins contre ces 3 maladies, mais aucun vaccin ne permet la vaccination contre ces 3 pathologies d'un seul coup. Le projet présenté concerne le développement d'un vaccin, protégeant contre ces 3 pathologies. Le lapin est un animal assez sensible au stress, ce nouveau vaccin contribuerait à limiter le stress des lapins par la diminution de leur manipulation pour les vaccinations.

Dans le cadre de ce développement, des essais sur l'espèce cible du vaccin (sensible à la myxomatose et la VHD), le lapin, doivent être menés afin d'évaluer l'innocuité du vaccin ainsi que son efficacité. Tous les essais sur lapins prévus dans le cadre ce projet sont encadrés réglementairement et constituent des pièces du dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) nécessaires à la commercialisation du vaccin.

La pharmacopée impose la recherche d'agents étrangers dans chaque lot de vaccin (test libératoire) afin d'en vérifier la pureté. L'essai indiqué par la pharmacopée est une recherche indirecte sur lapins (recherche d'anticorps). Cette recherche sera remplacée par une recherche directe (par le biais de techniques moléculaires) des agents étrangers spécifiés n'impliquant plus le recours à l'animal. Par ce biais, l'utilisation des lapins sera exclusivement limitée à la phase de développement du vaccin.

Le nombre maximal de lapins nécessaires au projet de développement (essais cliniques et essais préparatoires) est estimé à 1055 lapins. Le nombre de lapins à inclure dans chaque type d'essai (ou procédure) est fixé par la pharmacopée européenne. En nous appuyant sur des données expérimentales antérieures, il est prévu de cibler au mieux les essais préparatoires afin de limiter le nombre de lapins à inclure.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, les mesures suivantes sont appliquées :

-Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans la directive 2010 63 UE ;

-Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;

-Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien ou de croissance des lapins) sans restriction ;

-Manipulation des lapins dans des box isolés prévus à cet effet par du personnel qualifié ;

-Mise en place d'un suivi clinique rapproché par le vétérinaire responsable de l'essai ;

-Mise en place d'une procédure d'évaluation des points limites spécifiques de la myxomatose et de la VHD permettant d'euthanasier les animaux de façon anticipée.

11872 Les plaquettes sanguines jouent un rôle vital pour arrêter les hémorragiques en cas de blessures ou de lésions. Quand le taux de plaquettes circulantes chute en dessous de 10.000 plaquettes par

µL de sang chez un patient, le risque d'hémorragie interne devient important. Certaines pathologies plaquettaires ne peuvent actuellement être traitées que par la transfusion de concentrés plaquettaires. Ces concentrés sont issus de don de sang et représentent une source limitée. Même si aujourd'hui la production de plaquettes *in vitro* est possible, les rendements sont encore trop faibles pour suppléer au don de sang, en raison notamment du fait que la formation des plaquettes *in vitro* est différente de ce qui se passe *in vivo*. *In vivo*, les plaquettes sont continuellement produites dans la moelle osseuse à partir de cellules précurseur géantes, les mégacaryocytes (MKs). Afin de libérer les plaquettes dans la circulation sanguine, les MKs doivent traverser la monocouche jointive de cellules endothéliales (CEs). La manière dont les MKs traversent cette couche n'est pas encore comprise. Cette étape est essentielle puisqu'elle conditionne directement l'efficacité de production des plaquettes circulantes.

Dans le but d'élucider les mécanismes qui président à la libération des plaquettes *in vivo*, nous souhaitons caractériser finement les interactions entre les MKs et les cellules endothéliales. Pour réaliser ces études *in vivo*, nous utiliserons une approche 3D de microscopie fluorescence sur la moelle osseuse entière. Pour cela, nous allons d'abord une injection intraveineuse d'anticorps fluorescents permettant de marquer les MKs et les cellules endothéliales avec deux couleurs différentes puis prélever les os contenant la moelle osseuse (tibia, fémurs) sur l'animal sacrifié. Aucun effet secondaire n'est attendu suite aux injections d'anticorps, mais les animaux seront surveillés suivant cet acte.

Deux groupes de souris seront analysés : 1) groupe de souris C57BL/6 témoin et 2) groupe de souris traitées au SDF1 qui est un facteur destiné à augmenter le nombre de MKs accolés aux vaisseaux sanguins.

Ces procédures seront réalisées par du personnel qualifié en respectant le principe des 3Rs

Remplacer : Aucune méthode alternative ne permet le remplacement des animaux utilisés, car il s'agit d'une étude sur le système physiologique global. Par ailleurs, les mécanismes de production *in vivo* sont très différents de ce qu'on observe *in vitro*. Etudier ces mécanismes directement dans l'organisme reste indispensable pour élargir nos connaissances afin de pouvoir améliorer la production de plaquettes *in vitro* dans le futur.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences est le minimum nécessaire pour obtenir des résultats reproductibles statistiquement fiables seront minimalisés avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives.

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Enfin, une fiche de suivi est mise en place pour surveiller les animaux tout au long du processus de traitement. Les expériences ont toujours lieu sur des souris anesthésiées, maintenues au chaud tout au long de l'expérience pour éviter une hypothermie due à l'anesthésie.

Au total, en incluant tous les génotypes et traitements, ainsi que les expériences préliminaires pour le choix des anticorps fluorescents, nous prévoyons un maximum de 150 souris.

11873 Les troubles du spectre autistique (TSA) sont des maladies du neurodéveloppement qui apparaissent précocement au cours de l'enfance. Ils se manifestent par des altérations dans la capacité à établir des interactions sociales et à communiquer, ainsi que par des troubles du comportement. De façon intéressante, les naissances prématurées sont souvent liées à des phénomènes inflammatoires et les enfants prématurés ont dix fois plus de risque de développer des symptômes autistiques par rapport aux enfants nés à terme. Les lésions diffuses de la substance blanche (LSB) constituent la principale forme de lésion cérébrale du prématuré même si certaines lésions de la substance grise (LSG) peuvent également survenir. L'inflammation périnatale que subissent dans 20 à 40% des cas les enfants prématurés et la grande vulnérabilité des cellules cérébrales en développement à ce stress inflammatoire est à l'origine de l'apparition de la plupart de ces lésions. Elles induisent des handicaps moteurs, des déficits cognitifs et des troubles

comportementaux tels que les TSA qui persistent à l'âge adulte qui sont regroupées sous le terme d'Encéphalopathie du Prématuré (EDP). Les relais majeurs des modifications environnementales dans le cerveau sont les cellules immunitaires cérébrales. Ces cellules ont un rôle fondamental dans le développement et la maturation du SNC ; mais dans un contexte inflammatoire, ces cellules vont libérer des molécules toxiques qui vont retarder la maturation globale du cerveau, qui serait liée au développement de TSA. Pour comprendre l'impact de cette inflammation sur le développement cérébral, nous utiliserons un modèle de EDP induit par des injections de molécules inflammatoires chez le souriceau qui reproduit la pathologie humaine de l'enfant prématuré. Dans ce modèle largement utilisé, il sera étudié l'évolution des processus inflammatoires dans différentes régions cérébrales, des altérations de la maturation cérébrale et des déficits cognitifs à différents stades du développement.

Les expériences seront réalisées chez 315 souris sur une période de 5 ans. La bonne reproductibilité et le faible taux de mortalité (5%) de ce modèle expérimental permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques. Ce modèle expérimental est de sévérité modérée et n'entraîne pas de phénotype dommageable chez la souris. La mise en place de points limites (anémie, déshydratation, absence de prise de poids, lésions) ainsi que l'observation quotidienne du comportement des animaux permettront d'identifier et de limiter toute souffrance et douleur. Si l'un de ces points limites est atteint, les animaux concernés seront sacrifiés selon les méthodes réglementaires.

Cette étude prendra en compte la réglementation des 3R :

Remplacement : Les mécanismes impliqués dans l'EDP et dans les TSA mettent en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires au cours du développement cérébral qu'il est impossible de reproduire *in vitro*.

Réduction : Le nombre d'animaux estimé et les tests statistiques utilisés sont basés sur notre expérience pour ce type d'étude. Ce nombre minimum nous permettra d'être certains de répondre aux questions scientifiques de ce projet. L'analyse statistique de nos données nécessite n=30 animaux par groupe pour mettre en évidence une différence significative (total= 315). Nous prévoyons de dupliquer cette étude, toutefois s'il s'avère que 15 animaux par groupe suffisent nous n'en utiliserons que 158.

Raffinement : Les injections se feront en intra-péritonéale. Les animaux seront remis dans leur nid et on vérifiera quotidiennement que le retour au sein du nid se fait bien. Des grilles de scoring seront proposées en fonction de l'âge des animaux déterminants ainsi les points limites prédictifs : à la phase aiguë, on surveillera la fréquence respiratoire, la recoloration des extrémités, et le tonus ; à distance de l'inflammation on réalisera une surveillance régulière de la prise de poids, de l'absence de troubles du comportement (isolement, agressivité). Si l'un de ces points limites est atteint, les animaux concernés seront sacrifiés selon les méthodes réglementaires. Les animaux seront hébergés en groupe en milieu enrichi pour minimiser leur stress. A la fin de l'étude les animaux seront sacrifiés selon les méthodes réglementaires.

11874 La drépanocytose est la première maladie génétique au monde. Elle se traduit par la synthèse d'une hémoglobine anormale (HbS) qui, sous sa forme désoxygénée, polymérise et entraîne des modifications structurelles des globules rouges (GR) qui prennent alors la forme d'une faucille, deviennent plus fragiles, plus rigides et moins déformables. Chez les patients drépanocytaires (HbSS), la fragilité des GR falciformes entraîne leur destruction en excès, aboutissant à une anémie chronique (i.e. faible taux de GR dans le sang) associée à une faible oxygénation tissulaire. Plus rigides et moins déformables, les GR falciformes ont tendance à se bloquer dans les microvaisseaux, aboutissant à des crises vaso-occlusives (CVO) particulièrement douloureuses pouvant causer la défaillance de certains organes (rate, reins, cerveau, poumon, foie, os ...) et mettre en jeu le pronostic vital des patients. Des travaux que nous avons conduits chez des patients drépanocytaires et chez les modèles murins Townes ont permis de mettre en évidence de multiples conséquences de la maladie sur la structure musculaire (perte de masse, diminution de l'apport sanguin et en oxygène) et de la fonction musculaire (force maximale, montée en force, résistance à la fatigue). Les CVO, elles, entraînent une acidose intracellulaire et une augmentation de la

consommation de phosphocréatine. Nos travaux conduits chez la souris Townes montrent, de plus, que l'entraînement en endurance permet de réduire l'acidose intracellulaire et le dysfonctionnement musculaire, dû à la drépanocytose. Bien qu'aucune étude scientifique ne l'ait montré, l'exercice physique est déconseillé aux patients drépanocytaires pour éviter de possibles crises vaso-occlusives. Ainsi, l'exploration *in vivo* des effets de l'exercice intense et des CVO (mimé par un protocole d'ischémie-reperfusion) chez ces sujets est éthiquement inenvisageable. Avant cela, l'utilisation d'un modèle de souris drépanocytaires apparaît donc comme indispensable. Les combinaisons de traitement nécessitent aussi des essais sur le modèle murin avant de les effectuer chez l'Homme.

Design de l'étude

L'objectif de ce projet est de tester de nouvelles approches pharmacologiques et comportementales (activité physique régulière) dans le but d'améliorer le métabolisme énergétique et la fonction musculaire chez des souris Townes.

L'exploration du métabolisme énergétique sera réalisée au moyen de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du phosphore 31 (SRM du P31). Cette technique offre la possibilité de mesurer *in vivo* le pH intracellulaire et les concentrations des principaux composés phosphorylés (ATP, phosphocréatine, ADP, phosphate inorganique) impliqués dans le métabolisme énergétique. Ces mesures sont réalisées lors du protocole de repos-exercice-récupération et lors du protocole d'ischémie-reperfusion (mimant les CVO).

3R : Remplacer, Réduire et Raffiner

Nos travaux se dérouleront donc dans le strict respect de la règle des 3R. En effet, l'utilisation de la SRM du P31 permettra de par son caractère non invasif et totalement indolore de réduire le stress des animaux. La SRM du P31 réduira également le nombre d'animaux utilisés car elle permet d'enregistrer des cinétiques métaboliques chez les mêmes individus, contrairement aux techniques classiques de biochimie qui auraient nécessité de sacrifier des cohortes d'animaux aux différents temps de la cinétique afin de réaliser des dosages métaboliques sur biopsies musculaires. De plus, nous n'utiliserons que le nombre de souris nécessaires pour l'exploitation statistiques des données, à savoir 200 individus en tout (20 groupes de 10 souris). Ces expérimentations seront effectuées sous anesthésie générale, associé à du gel ophtalmique afin d'éviter le dessèchement oculaire. La température de la souris sera gardée stable à l'aide d'une couverture chauffante et observer à l'aide d'une sonde rectale inséré à l'aide de gel lubrifiant. Le réveil des souris sera effectué en cage individuelle sous lampe chauffante avant d'être remis avec ses congénères.

Par ailleurs, il est important de préciser que les critères métaboliques et fonctionnels que nous allons étudier sont de types physiologiques, et ne sont donc pas reproductibles avec des cultures de cellules musculaires ; c'est pourquoi nous ne pouvons pas remplacer l'étude chez l'animal vivant.

Toujours dans le respect de la règle des 3R, les procédures seront réalisées dans une pièce à l'écart de la salle d'hébergement. De plus, nous avons déterminé des points limites à ne pas franchir pour respecter le bien-être de l'animal : un contrôle quotidien de l'état clinique de nos animaux sera réalisé selon un système d'évaluation avec indices de 0 (normal ou léger) à 3 (changements importants par rapport à la normale) pour différents critères physiologiques et comportementaux (perte de poids, vocalisation importante, poils hérissés, prostration, blessures, infections cutanées). Le protocole sera arrêté pour tout animal obtenant un score supérieur ou égal à 2 dans deux de ces catégories. Les souris seront hébergées collectivement (4 à 5 animaux par cage) et le milieu sera enrichi par la présence dans chaque cage de matériel de nidation (coton), d'abris en plastique permettant aux animaux de se cacher, et de bûchettes de bois destinées à être rongées. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies *ad libitum*. Le changement des litières aura lieu une fois par semaine.

11875 Environ 350 millions de personnes sont atteintes de dépression à l'échelle mondiale et près de la moitié n'ont pas accès à un traitement efficace (rapport OMS, 2012). La résistance aux traitements pharmacologiques classiques est un phénomène de plus en plus décrit dans la littérature. Par conséquent, le développement d'alternatives et l'amélioration de l'arsenal thérapeutique existant

sont devenus des problématiques majeures pour les patients pharmaco-résistants. Ces dernières années, un progrès considérable a été accompli dans la stimulation électrique (stimulation cérébrale profonde) et superficielle (stimulation magnétique transcranienne) des zones cérébrales dysfonctionnelles chez les individus déprimés (comme le cortex préfrontal dorsolatéral ou le cortex cingulaire antérieur). Malgré sa précision, la stimulation cérébrale profonde reste une méthode lourde et invasive à laquelle peu de patients acceptent d'avoir recours.

A contrario, la stimulation magnétique offre l'avantage d'être non-invasive et en fait une technique intéressante. Cependant, son étude chez l'animal reste difficile compte tenu de la taille inadaptée des sondes humaines. Ainsi, peu d'études ont été réalisées sur le petit animal et les mécanismes qui sous-tendent les effets thérapeutiques que l'on retrouve chez les patients dépressifs restent majoritairement inconnus. Dans ce projet, une sonde magnétique adaptée aux rongeurs sera employée.

L'objectif de cette étude sera alors 1) d'observer si cette stimulation permet de réverser de façon durable les symptômes de la dépression et 2) comprendre quels mécanismes sous-tendent l'apparition des effets thérapeutiques.

Ce projet vise à développer une alternative thérapeutique aux patients pharmaco-résistants. Pour cette expérience, 96 souris réparties en 6 lots sont requises.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude :

Raffinement : le stress traumatique appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté, comparé à ce qui est pratiqué dans d'autres laboratoires. Les injections quotidiennes d'antidépresseur ont été remplacées par un traitement dans l'eau de boisson. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu. Les expérimentateurs sont experts dans la préhension/contention des souris et sont soucieux d'éviter tout stress lors de la réalisation des procédures. Afin de prévenir l'éventuelle douleur lors de l'injection un anesthésique local en gel sera appliqué au niveau du site d'injection.

Remplacement : aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire *in vitro* n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=16 sujets par groupe). Les souris seront uniquement mâles, afin d'éviter les variations comportementales provoquées par le cycle menstruel de la femelle et ainsi réduire le nombre total d'animaux. De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

11876 Il a été rapporté que le récepteur de la FSH (Follicle-Stimulating Hormone) (FSHR), normalement exprimé au niveau de l'ovaire et des cellules de Sertoli du testicule, est exprimé dans un grand nombre de tumeurs humaines. Cette expression est retrouvée quels que soient le type tumoral (colon, prostate, sein, poumon, ovaire, testicule, rein, etc.), le grade et le stade tumoral.

La présente saisine vise à réaliser un certain nombre de preuves de concept *in vivo* chez la souris : la première étape visera à développer un modèle murin porteur de tumeurs sous cutanées, au sein duquel FSHR devra être exprimé ; la seconde étape consistera à réaliser une étude de biodistribution d'un anticorps ciblant FSHR dans ce même modèle lorsqu'il est administré par voie intraveineuse. En cas de résultats probants, une troisième étape pourrait être la réalisation d'étude d'efficacité thérapeutique qui fera l'objet d'une demande d'autorisation de projet spécifique.

La présente saisine concerne un maximum de 24 souris, qui seront explorées par imagerie *in vivo* non invasive. Les dommages attendus sont liés à l'apparition de tumeurs sous-cutanées.

Ce projet sera mené conformément à la règle des 3R : examens d'imagerie non invasive sur animaux anesthésiés, qui ne susciteront pas de stress important à l'animal (raffiner). Le nombre d'animaux sera réduit au minimum avec 24 souris maximum qui seront utilisés (réduire).

Le développement de modèles animaux reste nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de modèles représentatifs de la complexité d'un organisme entier dans un contexte de cancer (remplacer).

11877 La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) sont 2 formes de maladies inflammatoires Chroniques de l'intestin (MICI) comportant des caractéristiques communes. L'étiologie de ces pathologies demeure encore méconnue mais les modèles animaux de ces pathologies suggèrent qu'une combinaison de facteurs génétiques, environnementaux, bactériens et immunitaires y contribue. L'aspect clinique des MICI humaines est hétérogène, un fait qui se reflète également par le nombre sans cesse croissant de modèle murin et de souches transgéniques de souris présentant des altérations intestinales. Les modèles murins de MICI peuvent être utilisés pour étudier les mécanismes physiopathologiques et ils sont des outils précieux pour tester les nouvelles stratégies thérapeutiques en phase préclinique. Les modèles d'inflammation intestinale induits chimiquement par le Dextran Sodium Sulfate (DSS), DSS/Azoxymethane(AOM), ou 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) ou par des souches bactériennes (telle que *Citrobacter rodentium*) sont les plus couramment utilisés. Bien qu'ils aient, comme tous les autres modèles, des limites, ils ressemblent, dans certains aspects immunologiques et histopathologiques, aux MICI chez l'homme et seront utilisés dans ce projet pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires.

Pour induire la formation de polypes dans le colon, les souris B6 et génétiquement modifiés reçoivent une injection de carcinogène, l'azoxyméthane (AOM). Pour induire une colite, cinq jours après ils reçoivent ad libidum une solution de DSS dilué dans l'eau de boisson pendant 5 à 7 jours suivie de 2 à 10 jours d'eau de boisson normale, constituant 1 cycle de DSS/eau. La colite chronique est obtenue par 3-4 répétitions du cycle DSS/eau. La colite peut aussi être obtenue après une seule administration intrarectale de solution hydroalcoolique de TNBS.

Afin d'étudier l'inflammation, les souris B6 et génétiquement modifiés reçoivent per os une suspension contenant 10⁹ CFU de *C. rodentium* (souche bactérienne DBS 120K) une seule fois, et sont suivies entre 3 et 40 jours.

Ce protocole a pour but d'étudier le rôle de cytokines, récepteurs, ou voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte dans la colite, à l'aide de souris déficientes pour les gènes correspondants. Ces souris ne présentent pas d'immunodéficience forte ; cependant elles sont plus susceptibles aux pathogènes et sont donc maintenues dans un environnement avec un statut sanitaire contrôlé. Dans ces modèles d'inflammation intestinale, les animaux vont ressentir une douleur abdominale qui mime les douleurs ressenties par les patients atteints de la maladie de Crohn, pouvant aller jusqu'à l'application du point limite.

Ce projet s'inscrit dans la continuité du projet « Etude des réponses immunitaires impliquées dans la colite chez la souris »

qui a fait l'objet d'une évaluation en 2013 pour les modèles chimiques DSS (Procédure 1) et TNBS (procédure 3) et avait permis de mettre en évidence le rôle de certains médiateurs de l'inflammation comme la voie des IL-1. Ce projet permettra d'étudier le rôle d'autres voies d'activation.

Cette étude est effectuée *in vivo* car plusieurs niveaux de complexité sont nécessaires, impliquant des interactions entre différents types cellulaires et organes ainsi qu'avec le microbiote intestinal, aspects qui ne peuvent pas être développés *in vitro* ou *in silico*.

Dans un souci de respecter la règle des 3R, des groupes d'animaux entre 5 et 6 seront utilisés de façon à limiter le nombre de répétitions de chaque procédure expérimentale tout en ayant un nombre suffisant d'individus pour valider statistiquement les résultats obtenus. Seules les expériences les plus pertinentes seront répétées 3 fois et les animaux de groupes équivalents de plusieurs expériences indépendantes seront rassemblés pour publication scientifique.

Chaque procédure utilisera 528 souris au maximum. Quatre procédures différentes doivent être utilisées dans ce projet ce qui correspond à un nombre maximal de 2112 souris durant toute la durée du projet (5 ans).

Chaque procédure sera suivie quotidiennement, y compris les week-ends, pour s'assurer du bien-être des animaux. Les analgésiques interférant avec les mesures expérimentales, si des animaux présentent un début de signes de souffrance (point limite prédictif : perte de poids supérieure ou égale à 20% et/ou score de 4 (décrit en paragraphe 3.4.13), ils seront mis à mort.

11878 La maladie d'Alzheimer toucherait près de 50 millions de personnes dans le monde aujourd'hui et aucun traitement n'est disponible pour stopper ou ralentir l'évolution de cette maladie neurodégénérative. La maladie d'Alzheimer est définie par la présence de deux "anomalies" dans le cerveau des patients : des "plaques" de protéines amyloïdes et des "agrégats" de protéine Tau. Ces 20 dernières années, la recherche scientifique et médicale s'est focalisée sur les plaques amyloïdes mais des études récentes ont montré que les "anomalies" Tau étaient en fait celles qui corrélaient le mieux avec les troubles cognitifs des patients. Aussi, il est actuellement supposé que les "anomalies" Tau (très toxiques pour les neurones) pourrait se propager dans le cerveau des patients de neurones en neurones comme des prions (c'est-à-dire comme des protéines infectieuses) et tuer les cellules les unes après les autres, dans tout le cerveau. Ce modèle expliquerait la progression inéluctable de la maladie vers la démence une fois le processus neurodégénératif enclenché.

Les mécanismes de transmission des protéines Tau toxiques d'un neurone à l'autre sont aujourd'hui mal connus. Nous formulons ici l'hypothèse que cette transmission pourrait faire intervenir un autre acteur, facilitant cette transmission : les cellules microgliales. Ces cellules sont en effet connues pour "manger" dans certaines circonstances les terminaisons des neurones. Nous pensons que ce mécanisme, appelé "pruning" pourrait faciliter le passage des protéines Tau pathologiques d'un neurone à l'autre. Dans la mesure où ce mécanisme de "pruning" est dépendant d'une protéine appelée C3, nous voulons observer comment se propage la protéine Tau dans le cerveau de souris privées de protéine C3 (C3-KO), pour mieux comprendre le rôle des cellules microgliales et du "pruning" synaptique dans la propagation de la pathologie. En effet, si la microglie et le "pruning" synaptique sont impliqués comme on le pense dans la transmission des protéines Tau anormales, alors nous devrions observer un ralentissement –voire un blocage- de ce processus chez les souris C3-KO par rapport à la même injection réalisée chez des souris "contrôles".

L'étude de ces mécanismes nécessite l'utilisation de cerveau « entier », avec l'ensemble des cellules qui le compose ; ces travaux doivent donc être menés *in vivo* chez l'animal. Nous proposons d'injecter chirurgicalement des protéines "Tau" pathologiques, extraites de cerveaux de patients, directement dans le cerveau des souris afin de suivre la dissémination du processus neurodégénératif avec et sans protéines C3. Une euthanasie sera pratiquée 9 mois après l'injection chirurgicale des protéines afin de récupérer les cerveaux pour analyse. Dans le respect des règles éthiques actuelles, de raffinement et de réduction, les expérimentateurs formés porteront une attention particulière aux animaux afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'analgésiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures, soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Ils auront à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après la chirurgie initiale. Les chirurgies se feront sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès leur réveil et qui sera maintenue tant que l'animal montre des signes de souffrance. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances inutiles aux animaux.

Nombre d'animaux : 40

11879 Les sarcomes sont des tumeurs rares complexes et hétérogènes qui touchent environ 4000 personnes par an en France. Après la chirurgie, peu de traitements sont disponibles hormis des chimiothérapies classiques souvent peu efficaces. Il existe donc dans cette pathologie un réel besoin de nouvelles thérapies plus ciblées permettant une meilleure efficacité et moins d'effets

secondaires. Dans ce contexte, de nombreuses études ont montré ces dix dernières années qu'une protéine apparaissait comme une nouvelle cible prometteuse dans le traitement de nombreux cancers. Il a notamment été montré qu'elle était impliquée dans la croissance des cellules cancéreuses et dans la résistance aux chimiothérapies. Une nouvelle thérapie disponible contre cette protéine a d'ores et déjà montré de très bons résultats dans de nombreux cancers comme le cancer du sein, du pancréas ou les glioblastomes et fait actuellement l'objet d'un essai clinique dans les tumeurs solides réfractaires.

Dans les sarcomes, les études *in vitro* faites par notre laboratoire ont montré que cette thérapie permettait de réduire la viabilité des cellules cancéreuses de manière très efficace. Nous souhaiterions donc maintenant vérifier cette efficacité *in vivo* dans des modèles de sarcomes xénogreffés chez des souris immunodéficientes. L'objectif est ici de vérifier son efficacité dans un système intégré en monothérapie mais également en combinaison avec des chimiothérapies utilisées dans le traitement des sarcomes.

Pour réaliser ce projet, nous estimons avoir besoin de 160 souris immunodéficientes sur un an.

Dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Nous avons étudié les effets biologiques et pharmacologiques de nombreuses nouvelles molécules en développement sur des lignées de sarcomes *in vitro*. Nous souhaitons dorénavant étendre ces études à un modèle plus complet qu'est le petit animal. En effet, l'oncogenèse est un modèle intégré qui fait intervenir un grand nombre de mécanismes physiologiques et de tissus avoisinants qui ne peuvent être modélisés *in vitro*. Nous devons donc avoir recours à un modèle physiologique complet et fonctionnel.

Réduction : Nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. La croissance tumorale des cellules greffées sera suivie de manière longitudinale tout au long de l'expérience ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : Le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort, les animaux seront hébergés en groupe et l'enrichissement de leur milieu de vie sera systématique. Les animaux recevront une surveillance quotidienne et des soins adaptés (administration d'analgésiques et anesthésiques en pré et/ou postopératoire, mesure hebdomadaire du poids des souris et du volume tumoral, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt).

11880 Le virus Chikungunya (CHIKV) est un arbovirus transmis par des moustiques du genre *Aedes*. Ce virus a récemment provoqué de grandes épidémies liées à un nouveau vecteur (le moustique *Aedes albopictus*) et s'est propagé dans des régions où il n'avait jamais été détecté précédemment. L'infection par le CHIKV provoque classiquement chez l'homme des douleurs articulaires associées parfois à une éruption cutanée. Il n'existe à ce jour aucun vaccin contre cette infection virale.

L'objectif de cette étude est de répondre à la question d'une propagation possible d'un candidat vaccin contre le CHIKV via une transmission par le moustique.

Nous proposons ici de tester deux candidats vaccins du CHIKV. Ce sont des virus atténués par modification de leur génome, capables de se répliquer chez le moustique une fois inoculés. Compte-tenu de la propriété des deux candidats vaccins à se répliquer, nous nous posons la question de leur transmission par le moustique. Les femelles moustiques du genre *Aedes* (*Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*) piquent un hôte vertébré pour se procurer le sang indispensable à la maturation de leurs œufs. Si le moustique pique une personne virémique (virus présent dans le sang), le virus est ingéré avec le sang absorbé par la femelle. Après une phase de multiplication et de dissémination du virus dans les organes internes du moustique, le virus est transmis à l'homme lors d'une pique du moustique par l'intermédiaire de la salive émise par le moustique.

L'objectif de cette étude est de déterminer (i) si les candidats vaccins contre le CHIKV qui se multiplient chez un hôte vertébré peuvent infecter un moustique et (ii) si ce moustique peut à son tour transmettre le virus à un autre hôte vertébré. Nous procéderons donc à des expériences *in vivo* pour évaluer :

- l'infection des souris par des moustiques infectés par les candidats vaccins ou le virus sauvage.
- l'infection des moustiques après prise de repas de sang sur souris infectées par les candidats vaccins ou le virus sauvage.

Au cours de toutes ces expériences, les souris seront transitoirement immunodéprimées afin de faciliter la transmission.

Le nombre total de souris est estimé à 250 souris femelles, réparties en 5 procédures de sévérité modérée. Ce projet sera d'une durée maximale de cinq ans.

Des infections expérimentales des deux espèces vectrices ont déjà été réalisées en laboratoire afin d'évaluer les taux d'infection, dissémination (propagation du virus dans les organes internes du moustique) et transmission (émission de salive contenant du virus) de deux candidats vaccin (produits *in vitro*) en comparaison au virus sauvage. Les résultats ont montré une différence dans le pourcentage de transmission, entre les deux espèces vectrices.

La pique des femelles moustiques engendre une légère réaction immunitaire due au contact de la salive injectée par l'insecte au moment de la prise de sang. Par notre expérience, nous ne notons pas de démangeaison cutanée constatée chez les souris piquées. Le volume de sang prélevé par une femelle moustique lors de la pique est sans risque pour une souris adulte.

Le virus CHIKV, lorsqu'il est inoculé chez la souris immunodéprimée peut entraîner une atteinte généralisée. Afin de réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse des souris, des points limites adaptés ont été choisis afin de détecter très précocement ce type d'atteinte : Une grille de scoring a donc été établie afin de détecter le plus précocement l'infection.

Le système d'infection artificielle du moustique, mettant en présence des globules rouges de lapin avec une quantité définie de virus amplifié sur culture cellulaire, ne nous permet pas d'étudier tous les paramètres impliqués dans la réplication et la transmission d'un virus entre 2 hôtes. Le recours à l'animal vivant pour répondre aux objectifs de ce projet est donc indispensable et aucune méthode alternative ne peut le remplacer.

En s'appuyant sur une analyse statistique, la taille des lots d'animaux a été ramenée au minimum nécessaire pour assurer la validité des résultats. De plus, notre expertise en entomologie et plus particulièrement, en transmission vectorielle, ainsi que les résultats obtenus lors d'un projet précédent, nous permettent d'optimiser certains paramètres expérimentaux comme le nombre de moustiques à mettre en contact avec une souris. Enfin, afin de réduire encore le nombre d'animaux utilisés, une série d'études pilotes avec un nombre restreint d'animaux seront réalisées et permettront de fixer certains paramètres pour les expériences suivantes.

Nous serons vigilants en ce qui concerne les signes de maladie et d'inconfort des animaux testés et les animaux seront surveillés quotidiennement et pris en charge par du personnel formé et expérimenté. Un système de score clinique a été mis en place afin de travailler avec des points limites précoces.

11881 Dans le but d'étudier la morphologie des structures par microscopie et l'implication de certaines protéines au sein d'une cellule ou d'un tissu donné, il est nécessaire d'utiliser des agents fixateurs qui vont permettre d'immobiliser les constituants tissulaires et cellulaires dans leur conformation. En effet, très rapidement après la mort, un grand nombre de molécules (enzymes) sont déversées par les cellules ce qui va entraîner une destruction de celles-ci.

Afin de pallier ces problèmes, nous utiliserons une technique qui consiste à injecter à un animal en état de mort cérébrale un agent fixateur afin de bloquer la libération de ces molécules et ainsi durcir les tissus d'intérêt. Cette méthode de conservation est nécessaire pour étudier l'implication de certaines protéines à un stade donné de développement. L'injection sera nécessairement réalisée chez un animal sous sédation profonde (mort cérébrale) mais avec un cœur qui continue à battre pendant 2 à 5 minutes maximum, afin que l'agent de fixation soit distribué par la circulation sanguine dans l'ensemble des vaisseaux sanguins et ainsi atteigne les structures les plus fines des tissus.

200 animaux (souris) maximum par an seront inclus dans cette procédure pour l'ensemble de l'institut soient 1000 maximum pour 5 ans.

Remplacement : Seules les études nécessitant une compréhension de l'organisation tissulaire utiliseront cette procédure. Pour les études à l'échelle de la cellule, les cultures cellulaires seront privilégiées.

Raffinement : Les animaux seront profondément endormis avec une forte dose d'anesthésique pour éviter toute souffrance. L'absence de réflexe et d'activité musculaire spontanée, la non-réaction au pincement à la patte seront vérifiés avant de débiter la procédure.

Cette technique couramment utilisée pour les études d'immunohistologies est réalisée par du personnel qualifié.

Cette demande concerne des animaux ne faisant pas l'objet d'autres procédures.

Ils seront issus d'établissement d'élevages agréés. Les conditions d'hébergement seront contrôlées (température, ventilation) avec accès libre à l'eau et à la nourriture, en milieu enrichi (carré de coton ou paille).

Réduction : Dans un souci de réduire le nombre d'animaux utilisés, les animaux contrôles sont mutualisés pour les différentes études. En effet, deux équipes travaillant sur deux organes différents utiliseront un seul animal.

11882 Chez les poissons téléostéens comme chez les mammifères, les lymphocytes T sont des cellules pilier du système immunitaire qui ont la particularité de se développer dans un organe spécifique : le thymus. Chez les mammifères cet organe lymphoïde primaire est hautement régulé par de nombreux facteurs environnementaux et physiologiques (âge, stress et statut reproducteur) ce qui s'illustre notamment par une plasticité thymique importante. Il a été précédemment montré, et ceci pour la première fois chez un poisson téléostéen, qu'une exposition de bars Européens *Dicentrarchus labrax* à un perturbateur endocrinien (œstradiol, E2) module la plasticité thymique ainsi que la différenciation des lymphocytes T et ceci fût associé à une inhibition des marqueurs de performance immunitaire.

Ces effets immunomodulateurs sont importants du point de vue physiologique pour éviter le rejet du fœtus chez les mammifères mais, chez le bar, la fonction reste inconnue. De même, si le thymus peut subir des phénomènes d'involution suivis de reformation chez les poissons et les mammifères, la régulation endocrinienne, l'influence environnementale, la fonction biologique ainsi que les répercussions biologiques et immunitaires restent peu connues voire inconnues chez les poissons. Afin de pouvoir mieux comprendre les facteurs contrôlant cette plasticité thymique qui a des impacts en termes de défense immunitaire, deux expériences vont être menées :

La première expérience (exp 1) tend à améliorer les connaissances sur la plasticité thymique chez le bar et donc un suivi mensuel sera réalisé pendant 12 mois sur deux cohortes de bars élevées, soit en conditions environnementales constantes (photopériode et température) (exp 1.1), soit en conditions mimant les variations environnementales saisonnières (exp 1.2). Ce suivi sur un an permettra notamment de couvrir des états physiologiques différents (e.g., différenciation sexuelle). De plus, les effets d'un perturbateur endocrinien synthétique (éthynylestradiol : EE2) sur la plasticité thymique ainsi que la différenciation et l'exportation des lymphocytes T seront également étudiés dans une expérience 2. Pour ces études, des bars juvéniles seront exposés au laboratoire dans des aquariums en système semi-ouvert. Que ce soit pour l'exp 1 ou 2, les différents organes de l'immunité (rate, rein antérieur et thymus mais aussi le foie et l'intestin) seront prélevés mensuellement et chaque poisson fera l'objet de multiples analyses (indices biométriques, expression de gènes, immunohistochimie, cytométrie en flux et analyse des dépenses énergétiques). L'objectif d'étudier la régulation endocrinienne et les effets d'un perturbateur endocrinien est notamment de déterminer si ces composés, largement présents dans l'environnement, pourraient altérer l'immunocompétence des bars et donc participer au déclin de l'espèce en Europe de l'Ouest. Le nombre de poissons sera réduit au minimum grâce à une bonne connaissance de l'anatomie du thymus et des techniques utilisées mais aussi par évaluation du nombre minimum de poissons après une analyse statistique (G*Power, Dusseldorf©). Pour ce projet seront étudiés et sacrifiés : 360 poissons pour le suivi mensuel (exp 1.1 et 1.2) et 90 bars pour l'exposition à l'EE2 (exp 2) en raison d'une variation interindividuelle importante, de probables

différences entre mâles et femelles ainsi que l'impossibilité de distinguer les mâles des femelles phénotypiquement. Les bars seront élevés dans nos installations en conditions contrôlées avec un suivi quotidien et suivant les règles éthiques ainsi que le respect du bien-être animal. Par ailleurs, l'expérimentation sera menée dans le strict respect des 3R : les mesures de Raffinement prises pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux durant toute l'expérimentation animale se feront en utilisant la grille de score de la Fraunhofer Institute qui est un bon guide pour la prise de décision quant à la souffrance animale. Un animal qui présenterait une nage sur le dos avec des mouvements non coordonnés, nage erratique serait immédiatement euthanasié. Nous souhaitons qu'à la base de cette grille de score nous restions avec des animaux qui sont en code couleur vert et pour le sacrifice nous utiliserons une anesthésie par balnéation en eau glacée suivie d'une commotion cérébrale.

11883 Le projet de recherche a pour objectif de comprendre les mécanismes de formation du cœur, et la mise en place de l'architecture de la pompe cardiaque. Le muscle cardiaque, ou myocarde, est le tissu principal du cœur. Sa taille et son architecture orientée déterminent la contraction efficace du cœur. La disposition relative des chambres cardiaques est essentielle à la mise en place de la double circulation sanguine. Par l'étude de modèles rongeurs déficients pour des voies de signalisation, nous voulons mettre en évidence les mécanismes de croissance du myocarde et de positionnement des chambres cardiaques.

Nous utilisons différentes approches pour aborder ces questions, incluant la modélisation informatique (*in silico*) et les cultures cellulaires (*in vitro*), selon le principe de Remplacement. Cependant, les lignées cellulaires congelées ont dérivé de leur état initial et nous leur préférons des cultures primaires, correspondant à des cellules fraîchement dissociées d'un tissu. Ces cellules sont plus facilement obtenues à partir de rats. En général, les expériences de remplacement ne peuvent pas reproduire la complexité des mécanismes mis en jeu au cours du développement embryonnaire, comme la forme tridimensionnelle du cœur, l'intégration d'une multitude de signaux et d'interactions cellulaires. C'est pourquoi nous aurons aussi recours à l'étude d'embryons de souris porteurs de mutations dans différents gènes dont la fonction est importante au cours du développement.

Nous produirons des souris génétiquement modifiées, à l'état hétérozygote, ne présentant pas d'anomalie clinique. A partir de ces animaux, nous produirons des foetus ou nouveau-nés à l'état homozygote, afin d'étudier l'effet de la mutation sur le cœur, dans des analyses post-mortem. Nous aurons recours à des injections de substance ou de virus, afin de contrôler le moment où la mutation survient, de mesurer l'effet sur la multiplication des cellules ou de compenser l'effet de la mutation. La fonction cardiaque, sera mesurée par échocardiographie sur des animaux sous anesthésie générale. Au cours de ces procédures, les animaux seront surveillés pour repérer l'éventuelle apparition de signes cliniques pouvant indiquer une souffrance ou un mal-être.

Selon le principe de Réduction, le nombre d'animaux est calculé sur la base d'un plan expérimental stéréotypé permettant d'obtenir la puissance statistique nécessaire à l'obtention de conclusions biologiquement pertinentes. Le projet, prévu sur une durée de 5 ans, aura recours à 1474 animaux : 450 foetus de souris, 580 souris nouveau-nés, 225 souriceaux et 186 souris adultes, ainsi que 3 rats adultes et 30 rats nouveau-nés.

Ce projet de recherche fondamentale sur la formation du cœur a des retombées pour la compréhension des malformations cardiaques, qui affectent près de 1% des naissances, ainsi qu'en médecine régénérative, pour trouver des stratégies de réparation du cœur.

11884 La sclérose en plaque est une maladie neurologique auto-immune chronique du système nerveux central. Il s'agit de la démyélinisation progressive de la gaine de myéline entourant les fibres nerveuses des neurones. Ce phénomène est à l'origine du ralentissement ou de l'arrêt de la conduction nerveuse induisant une faiblesse musculaire, des troubles de la motricité, de la vision, etc. Elle touche chaque année des sujets jeunes entre 20 et 35 ans, soit environ 60 000 personnes en France.

D'une manière générale, les causes de la maladie ne sont pas bien identifiées et l'origine exacte de la pathologie reste inconnue. De même, aucune thérapie n'existe à l'heure actuelle pour soigner cette pathologie très invalidante. C'est pourquoi l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

La phase pré clinique qui consiste à l'étude de l'action des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments à viser anti-inflammatoire permettant de diminuer ou d'inhiber le développement de la maladie. La sclérose en plaque est induite par injection sous-cutanée d'une solution composée de MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) et d'un adjuvant qui est le *Mycobacterium tuberculosis* inactivé par la chaleur suivie de deux injections intra-péritonéale de toxine Pertussique. Ce cocktail immunogénique permet la dégradation progressive des fibres de myéline. Les animaux seront ensuite mis à mort au bout de 24 jours pour analyser différents paramètres immunologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité des molécules testées sur le développement de la maladie (signes cliniques) et de l'inflammation.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6. L'administration de la solution à l'animal se fait par voie sous-cutanée. Ce modèle induit des douleurs inflammatoires aiguës mais réversibles (une fois le pic de la maladie passer au jour 16, les animaux retrouvent progressivement leur mobilité entre 7 et 15 jours) à l'animal (qui se manifeste par une prostration, état moribond, une détresse respiratoire, des poils hérissés, une perte de poids), liées au développement de la maladie neurologique. Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les animaux sont hébergés par 5 dans des cages de 530 cm² (cage 1284L type II L). Les animaux seront mis à mort par inhalation de CO₂.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études. Une étude comportera jusqu'à 90 animaux en fonction du nombre de molécules à tester et du nombre de concentration par molécules, soit 1800 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant la sclérose en plaque.

Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. Des points limites sont mis en place et appliqués afin de limiter la souffrance de l'animal (cf tableau points limites 3.4.13) et un cocktail anesthésique/analgésique est administré aux animaux pour limiter la douleur.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

11885 Le système endocannabinoïde (EC) est impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire, du métabolisme énergétique et participe au développement de l'obésité et du diabète de type 2. Le fait qu'il soit profondément altéré au cours de l'obésité et que les EC soient capables de moduler la sensibilité à l'insuline des tissus et leur capacité à produire de l'énergie (captation de glucose, biogenèse mitochondriale) suggère un rôle potentiel du système endocannabinoïde dans le contrôle de l'homéostasie protéique, en particulier au niveau musculaire. Des résultats préliminaires obtenus montrent que certains antagonistes de ce système stimulent la synthèse protéique dans un modèle de cellules musculaires *in vitro*.

Le vieillissement est caractérisé par une perte progressive des fonctions physiologiques et des capacités fonctionnelles de l'organisme. La prévention de la perte de la masse et de la fonction musculo-squelettique liée à l'âge est donc d'une importance majeure, afin de maintenir les capacités physiques à un âge avancé, de préserver la mobilité, et donc une qualité de vie optimale pour les personnes âgées. La sarcopénie se définit comme la perte involontaire de masse, force et fonction

musculaires associées au vieillissement. Sa physiopathologie est complexe et résulte de la combinaison de l'altération de différents facteurs : augmentation de la dégradation protéique, diminution de la synthèse protéique, diminution de l'activité mitochondriale musculaire et résistance aux stimuli anaboliques incluant insuline et acides aminés. La résistance aux stimuli anaboliques observée avec l'âge est encore mal comprise mais pourrait résulter d'une infiltration lipidique musculaire accrue ou d'altérations mitochondriales. Ce type d'atteintes est également couramment observé au cours de l'obésité, et cette dernière accroît la fonte musculaire au cours du vieillissement. On parle alors d'obésité sarcopénique. Dans ce contexte, le système endocannabinoïde a un rôle majeur potentiel puisqu'il contrôle le développement de l'obésité, de l'insulinorésistance et l'activité mitochondriale.

Le rôle de ce système dans le contrôle de l'anabolisme musculaire et ses altérations éventuelles au cours du vieillissement n'ont à ce jour pas été caractérisés. L'objectif de cette étude sera d'étudier les liens potentiels entre système endocannabinoïde et anabolisme musculaire. Pour cela l'expression des différentes composantes du système endocannabinoïde au niveau musculaire ainsi que les concentrations plasmatiques et tissulaires en AEA et 2-AG (principaux endocannabinoïdes) seront mesurées. Différentes mesures de fonctions musculaires non-invasives, ainsi qu'une mesure de la synthèse protéique seront également réalisées afin de corrélérer la fonction musculaire aux potentielles altérations du système endocannabinoïde. Ce projet permettra d'identifier le système EC comme acteur majeur du maintien de la masse musculaire et de la mobilité au cours du vieillissement.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation *in vitro* ou *ex vivo* mais nous avons réduit le nombre d'animaux en optimisant le nombre d'animaux par lots. Nous mettrons en œuvre des méthodes permettant de limiter au maximum la douleur et la souffrance de nos animaux, en utilisant des cages adaptées et en surveillant quotidiennement les animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins ou d'exclusion d'animaux en souffrance. Afin de réduire la souffrance des animaux au cours de certaines des procédures expérimentales décrites, celles-ci seront réalisées sous anesthésie générale. Pour répondre aux objectifs de cette étude nous utiliserons 14 rats Wistar âgés de 6 mois et 14 rats Wistar âgés de 24 mois, soit un total de 28 rats.

11886 Le choc septique est stade le plus grave d'une infection. Il constitue un motif fréquent d'admission en réanimation (environ 70 000 par an en France) et il est responsable chaque année de nombreux décès du fait d'une mortalité importante (de l'ordre de 40% chez les patients en choc septique) malgré une prise en charge optimale. Les raisons pour lesquelles une bactérie peut être responsable d'une infection contrôlée ou d'un choc septique fatal ne sont pas encore complètement comprises. Une recherche scientifique est donc nécessaire pour mieux comprendre la physiopathologie du choc septique, afin de trouver de nouveaux marqueurs diagnostiques et de nouveaux traitements.

Cependant, de plus en plus de travaux s'intéressent aux complications faisant suites à un choc septique. En effet, de nombreuses études observationnelles ont montré un taux de mortalité plus important, chez les personnes qui survivent à un épisode de choc septique.

Parmi les causes responsables de ce surcroît de mortalité chez ces patients, des travaux récents mettent en évidence plusieurs facteurs potentiellement impliqués :

- une augmentation ses événements cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux) dans l'année suivant un épisode septique sévère, probablement du fait d'une dysfonction endothéliale induite.
- une augmentation des épisodes infectieux via des dysfonctions immunitaires complexes et soutenues dans le temps, touchant à la fois le système immunitaire inné et adaptatif, faisant suite à un choc septique.

Notre projet vise donc à mieux comprendre les mécanismes biologiques à l'origine de ces dysfonction endothéliales et leucocytaires.

L'un des mécanismes biologiques connu pour altérer de manière durable les fonctions endothéliales et leucocytaire est la sénescence induite.

En effet, la recherche sur les maladies cardio-vasculaire a révélé l'existence de cellules sénescents dans les muscles lisses et l'endothélium des vaisseaux des patients atteints d'athérosclérose. Il serait donc possible que la sénescence endothéliale contribue à l'installation ou à la progression des maladies cardio-vasculaires.

De même, l'immunosénescence consistant en une altération fonctionnelle de l'immunité innée et surtout de l'immunité adaptative pourrait être majorée après un choc septique.

L'objectif est in fine d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour des traitements plus efficaces et plus précoces. Notre projet sera réalisé à l'aide d'un modèle de souris en choc septique, d'origine polymicrobienne, par péritonite.

La règle des 3 R : réduire, raffiner, remplacer constituant le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale sera scrupuleusement respectée.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives (t-test, one way ou two-way ANOVA selon les expériences). Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- toutes les expériences seront réalisées sur des animaux anesthésiés
- les animaux sont alors replacés dans leur cage d'origine avec des congénères qui ont subi la même opération. Un gel nutritif est présent dans la cage ainsi que la nourriture standard déposée au fond pour faciliter la prise de nutriments et l'hydratation, ainsi que du coton cardé pour permettre aux animaux de se maintenir au chaud.
- des traitements antalgiques seront administrés
- les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées à leur état
- les expériences sur animaux vigiles auront une durée limitée dans le temps
- en fin d'expérience, le sang sera prélevé à l'aorte des animaux anesthésiés, qui seront ensuite mis à mort et différents tissus seront prélevés.

Remplacer : Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible car les effets d'un choc septique sur l'ensemble de l'organisme sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires chez l'être vivant.

Cependant, l'identification préalable des mécanismes moléculaires probablement impliqués ont sont en cours d'étude à l'aide de méthode alternative (modèle de cultures cellulaires stimulées par une endotoxine).

L'ensemble de ces expériences nécessitera au maximum 220 souris.

11887 La greffe reconstructive de tissu allogénique est devenue une option viable pour restaurer la forme et la fonction de tissus endommagés. La découverte de cellules souches (CS) capables de se renouveler et de générer différents types cellulaires a suscité un énorme intérêt au vue des perspectives thérapeutiques nouvelles qu'elle ouvrait dans le traitement des processus dégénératifs du cerveau et de la moelle épinière. Ce projet vise à développer une stratégie de régénération du nerf facial par l'intermédiaire de xénogreffes de cellules souches rendant l'utilisation des animaux indispensable. L'objectif ici consiste à différencier des précurseurs neuraux en motoneurones efficaces et matures pour contribuer à la réparation fonctionnelle du nerf facial après sa lésion. Par leur capacité de migration et de différenciation spontanée en différentes classes de neurones au niveau du système nerveux central, les cellules souches dérivées des capsules frontières (cellules BC), prélevées au niveau du derme du dos de souris nouveau-nés, seront utilisées pour tester leur capacité à former des motoneurones. Nous introduirons dans ces cellules souches une protéine antioxydante, la sélénoprotéine T (SeIT), dont nous avons récemment démontré les effets

protecteurs et pro-différenciateurs dans des cellules nerveuses. Les cellules BC, modifiées ou non, seront injectées chez des rats Long-Evans âgés de huit semaines au niveau du nerf facial préalablement lésé à sa sortie du foramen stylo-mastoïdien. Cinq groupes d'animaux seront comparés. Un total de 97 rats et 70 souriceaux seront utilisés dans cette étude. Ce total d'animaux s'appuie sur les travaux menés précédemment sur la régénération nerveuse périphérique. Ces effectifs tiennent compte de décès éventuels ou de mise à mort anticipée qui serait nécessaire dans le cas où un animal aurait atteint un point limite de souffrance non acceptable. Afin de réduire le nombre total d'animaux, les animaux nécessaires aux prélèvements d'organes indispensables pour réaliser des études biologiques ultérieures seront ceux qui auront été utilisés pour les analyses fonctionnelles.

La migration, la survie, la différenciation motoneuronale et l'intégration des cellules transplantées dans le réseau neuronal seront comparés au sein des différents groupes dans un premier temps. Puis dans un second temps, des études fonctionnelles seront réalisées de manière hebdomadaire pendant 10 semaines (de la 2^{ème} semaines pré-opératoires jusqu'à la 8^{ème} semaine post-opératoire) permettant d'apprécier la capacité de régénération des cellules injectées. Après sédation à l'isoflurane, les rats seront placés dans un système de contention douce. Plusieurs tests vidéo-assistés seront réalisés : le réflexe de clignement, le mouvement des vibrisses et l'évaluation de syncinésies. Les enregistrements débuteront lorsque des signes d'habituation (ralentissement des mouvements parasites des pattes, de la tête ou du whisking) à la contention seront observés. La durée de la contention n'excédera pas 30 minutes limiter la souffrance chez l'animal. A la fin de ces 10 semaines d'enregistrement, les rats seront euthanasiés (par décapitation) après une anesthésie profonde à l'isoflurane (5%). L'intégration des cellules BC, la formation des jonctions neuromusculaires ainsi que la fonctionnalité des cellules greffées seront de nouveau évaluées à ce stade. Pour lutter contre toute douleur occasionnée, les rats recevront systématiquement une injection intrapéritonéale de buprénorphine avant et après tout acte chirurgical (lésion du nerf facial, injection de cellules souches). Une administration quotidienne de paracétamol pourra être également réalisée en post-opératoire.

Les conditions d'hébergement seront conformes aux conditions recommandées. Les rats seront hébergés en groupe avec enrichissement du milieu et placés sous un cycle jour/nuit 12/12h avec accès illimité à l'eau et à la nourriture. Durant les deux premières semaines post-opératoires, les animaux nécessiteront d'être isolés afin de garantir une bonne cicatrisation. La température des pièces d'hébergement et d'expérimentation sera maintenue à $22 \pm 1^\circ\text{C}$. A partir de la 6^{ème} semaine de vie, les rats seront pesés hebdomadairement et habitués à la manipulation par l'expérimentateur. Durant toute la durée de l'expérimentation, un suivi des animaux sera réalisé biquotidiennement qui permettra de déceler un éventuel signe de souffrance. Une pesée sera réalisée quotidiennement durant la première semaine post-opératoire, puis tous les 3 jours la deuxième et troisième semaine suivant l'injection des cellules BC et enfin de manière hebdomadaire jusqu'à la fin de la procédure. Des pesées supplémentaires pourront être réalisées si des signes de mal être de l'animal sont observés comme une posture « dos voûté », une lenteur des mouvements, une prostration, des plaies, des vocalisations anormales ou encore une agressivité importante. Le poids de l'animal sera comparé aux courbes de poids fournies par le fournisseur ainsi qu'avec le poids des animaux témoins. Si l'un de ces signes ou une combinaison de signe apparaît, le suivi de l'animal sera renforcé dans les heures qui suivent son apparition. Si l'état de l'animal s'aggrave dans les heures qui suivent ou ne s'améliore pas, il sera considéré qu'un niveau de souffrance intolérable est atteint et une mise à mort sera réalisée. Toute mise à mort (décapitation) sera réalisée après anesthésie à l'isoflurane (5%).

Selon l'efficacité de différenciation spontanée des cellules greffées en motoneurone, une étape de différenciation *in vitro* pourrait être réalisée avant l'injection. Nous espérons que cette étude permettra d'identifier une nouvelle source de cellule souche pour améliorer la régénération nerveuse et de tester l'intérêt d'introduire une protéine antioxydante dans ce modèle, une stratégie qui pourrait être transposable en clinique chez l'Homme.

11888 La vaccination est l'une des avancées les plus importantes de l'histoire de la médecine. Les vaccins préparent le corps à reconnaître et à maîtriser les maladies. Ils entraînent le système immunitaire à reconnaître des parties spécifiques de l'agent pathogène visé : les antigènes. Il existe de nombreux vecteurs vaccinaux qui permettent de présenter l'antigène au système immunitaire tel que les bactéries, les vecteurs viraux ou les vecteurs synthétiques. De plus en plus de stratégies vaccinales sont basées sur l'emploi de vecteurs dérivés de virus comme les vecteurs lentiviraux ou adénoviraux. Ces vecteurs, amputés des séquences pathogènes pour l'homme, contiennent des séquences codant pour un antigène vaccinal. Les vecteurs lentiviraux peuvent infecter un large panel de types cellulaires et sont des vecteurs vaccinaux particulièrement efficaces pour l'induction de réponses immunitaires. Cette efficacité pourrait être due à un tropisme préférentiel du vecteur lentiviral pour des cellules qui sont spécialisées dans la présentation de l'antigène et qui ne se divisent pas ou peu. Cela induirait une présentation persistante de l'antigène qui pourrait expliquer cette meilleure réponse immunitaire. Ce n'est pas le cas des vecteurs dérivés de l'adénovirus humain dont l'infection résulte en une présentation transitoire de l'antigène probablement également liée à la nature des cellules exprimant l'antigène.

L'objectif de ce projet est de comparer les interactions cellulaires mises en jeu suite à une vaccination par des vecteurs lentiviraux ou adénoviraux. Pour reproduire ce qui se déroule chez l'homme lors de la vaccination et comprendre les mécanismes basés sur les interactions entre différentes cellules dans divers organes, cette étude doit être menée dans un organisme vivant. De par leur facilité d'emploi et grâce aux nombreux réactifs disponibles, nos expériences seront réalisées sur des souris adultes femelles.

Les quatre procédures de sévérité légère qui composent ce projet consistent à vacciner des souris avec les deux vecteurs et à comparer la mise en place de la réponse immunitaire. En effet, les mécanismes impliqués lors de ces vaccinations sont différents et nous souhaitons disséquer ceux-ci afin d'évaluer leur influence sur la réponse immunitaire. Le bénéfice attendu de cette étude comparative de vecteurs vaccinaux est de permettre une meilleure compréhension des méthodes vaccinales et d'optimiser leur utilisation.

Les deux types de vecteurs sont largement utilisés chez la souris et aucune souffrance n'a été reportée. Néanmoins, les animaux seront surveillés étroitement, et seront mis à mort si des signes cliniques sont observés. Le nombre d'animaux à utiliser a été déterminé avec l'aide d'un biostatisticien et des tests statistiques de type ANOVA seront réalisés. Grâce aux expériences menées antérieurement, nous avons déterminé la taille limite de nos groupes de manière à obtenir des résultats fiables tout en évitant la surutilisation d'animaux. De plus, les vecteurs utilisés dans ce projet seront caractérisés *in vitro* avant l'emploi chez la souris.

Nous estimons à 1032 le nombre maximal d'animaux utilisés dans ce projet sur une période de 5 ans.

11889 L'insuffisance cardiaque (IC), incapacité progressive du cœur à fournir un débit sanguin nécessaire aux besoins métaboliques d'un individu dans la vie courante, est la seconde cause de mortalité dans les pays occidentaux. La réponse définitive au problème d'insuffisance cardiaque est le rétablissement du débit cardiaque, ce qui n'est, à ce jour, pas pris en charge par la médication, et les dispositifs d'assistance ventriculaire peu efficaces et trop coûteux.

L'objectif global du projet est d'expérimenter les principales fonctions de certains éléments composant le nouveau type de mini-pompe cardiaque dénommée « ICOMS » (Implantable Cardiac Output Management System) synchronisée avec le cycle cardiaque, de petite taille et sans câble transcutané.

Dans le présent projet, le transfert de puissance entre la partie interne et la partie externe du TET (Transcutaneous Energy Transfer), la communication des données et la détection du signal cardiaque seront vérifiés.

Afin de tester ce dispositif, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable. En effet, pour valider le fonctionnement entier du dispositif, le remplacement des essais *in vivo* n'est pas possible, les conditions du vivant étant extrêmement difficiles voire impossibles à reproduire dans son intégralité.

sur table. Le modèle animal choisi est le mouton qui permet de reproduire des résultats qui seront applicables chez l'Homme. Le nombre d'animaux est réduit à deux ce qui est le minimum pour pouvoir tester l'ensemble des paramètres permettant de répondre aux objectifs. Tout au long de la réalisation de l'expérimentation, des mesures de raffinement seront prises pour répondre au bien-être des animaux : ils auront à leur disposition des mesures d'enrichissement (paille, foin...). Les animaux seront surveillés plusieurs fois par jour. Les soigneurs seront vigilants à la prise alimentaire, au comportement et à la locomotion des animaux. Un animal anorexique, prostré recevra l'administration d'analgésique. Sans réponse physiologique satisfaisante, il sera procédé à la mise à mort suivie du prélèvement du site lésionnel pour transmission aux scientifiques.

11890 Objectif du projet :

Développement d'un futur traitement chez le chien à base d'anticorps monoclonaux dirigés contre une protéine impliquée dans la dermatite atopique canine.

La dermatite atopique :

La dermatite atopique, ou atopie, est une maladie inflammatoire chronique provoquant d'importantes démangeaisons (prurit) chez le chien. C'est la deuxième cause de prurit chez le chien après la dermatite par allergie aux piqûres de puces (DAPP). 10 à 15% des chiens sont concernés. Il existe une prédisposition génétique à la dermatite atopique. Les symptômes apparaissent généralement entre l'âge de 2 mois et 3 ans. La dermatite atopique peut avoir un caractère saisonnier en début d'évolution, avec des améliorations spontanées, mais l'affection tend à s'aggraver au cours du temps et les symptômes s'expriment ensuite toute l'année. Les principaux symptômes rencontrés lors de dermatite atopique sont des démangeaisons et de l'érythème (rougeurs). Des lésions secondaires au grattage peuvent ensuite apparaître : chute de poils, croûtes, épaississement de la peau, etc...

Traitement actuel :

Aujourd'hui il n'existe pas de traitement sur le marché. Les solutions disponibles servent uniquement à soulager les démangeaisons.

Détail du projet :

Notre société propose des services à façon de développement d'anticorps depuis 1980. Pour le compte d'un industriel, leader dans le secteur vétérinaire, la société souhaite lancer prochainement un programme d'immunisation de chiens afin de générer, grâce à sa plateforme entièrement dédiée, des anticorps qui seront ensuite caractérisés afin d'identifier le meilleur candidat pour la future thérapie. La production d'anticorps nécessite d'avoir recours à des mammifères vivants, et afin d'optimiser l'efficacité et la tolérance du traitement dans l'espèce canine, ce dernier doit être développé à partir de chiens.

Nombre de chiens pour le programme : 2 chiens.

Ce nombre a été optimisé et minimisé dans le respect des animaux et pour le bon déroulement du projet. Protocole optimisé et validé afin de limiter au maximum les risques pour les animaux.

Espèce et âge : Beagle ; 6-8 mois max

Procédures envisagées : 5 injections toutes les 2 semaines ; prélèvement des sérums qui contiennent des anticorps ; prélèvement de la rate pour isolation des cellules B et développement d'anticorps recombinants.

A des fins de raffinement des conditions d'hébergement des animaux, ceux ci seront maintenus en groupes sociaux compatibles. Pour éviter l'euthanasie terminale des animaux, ils subiront une splénectomie qui est une chirurgie fréquente chez le chien et qui est très bien supportée. Cette opération chirurgicale est la seule intervention douloureuse prévue dans ce projet et elle se déroulera dans les meilleures conditions d'anesthésie et d'analgésie utilisables chez le chien. Suite à cette intervention et après une phase de récupération et de cicatrisation, les animaux seront soit réutilisés dans des programmes peu invasifs, soit placés.

11891 Les gliomes font partie des tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte. Ces tumeurs invasives représentent 80% des tumeurs malignes du cerveau. Les gliomes sont classés par l'organisation mondiale de la santé selon le grade de malignité, le phénotype glial et les altérations moléculaires. Les glioblastomes (GBM ; astrocytomes de grade IV) constituent les gliomes les plus agressifs, ils surviennent à un âge plus avancé (65 ans de moyenne d'âge) que les gliomes de bas grade. Par ailleurs, ils résistent aux traitements disponibles actuellement et récidivent inexorablement ; l'hétérogénéité intra et inter-tumorale est une des causes envisagées de l'inefficacité des traitements. Les cellules du microenvironnement composé en grande majorité par des macrophages, génèrent un stroma favorisant l'expansion et l'invasion des cellules tumorales, en établissant par exemple des mécanismes d'immunosuppression. Un des mécanismes régulant ce phénomène est la sénescence cellulaire. Le but de ce projet est d'étudier et de caractériser le rôle de la sénescence au cours de la gliomagenèse primaire et au cours de la récurrence.

Les cellules sénescents sont caractérisées par un ensemble de propriétés notamment l'arrêt permanent du cycle cellulaire, la sécrétion de protéines capables d'agir sur le microenvironnement de la tumeur et l'expression de l'enzyme β -Galactosidase. La sénescence est provoquée par des stress cellulaires qui induisent l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire p16Ink4a/RB ou p19Arf/p53/p21. Nos études préliminaires ont identifié des cellules sénescents au niveau des GBM de patients et au niveau d'un modèle murin de GBM. L'identité des cellules sénescents dans les deux modèles est hétérogène ; ces cellules peuvent être de type tumoral ou glial (macrophages associés à la tumeur ou astrocytes). Par ailleurs la délétion de cellules sénescents exprimant p16Ink4a dans le modèle murin de GBM augmente de façon significative la survie des souris comparée aux souris contrôles. Ces résultats montrent que les cellules sénescents jouent un rôle pro-tumoral au cours de la gliomagenèse primaire. Nous souhaitons à présent approfondir cette étude en suivant dans le temps et au niveau de l'animal entier la progression tumorale avec ou sans délétion des cellules sénescents par la méthode de bioluminescence. Nous étudierons également le rôle des cellules sénescents dans deux autres paradigmes ; 1) dans un modèle de récurrence après un traitement (irradiation et chimiothérapie) comparable à celui pratiqué pour soigner les GBM chez les patients. En effet l'irradiation et la chimiothérapie font partie des stress induisant la sénescence ; 2) dans des souris âgées (>22 mois) car la sénescence est un mécanisme qui s'accumule avec l'âge et pourrait avoir une incidence dans le processus d'oncogenèse initial.

Nous utiliserons sur 5 ans un total de 312 souris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction ; le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides (8 souris par condition expérimentale) ; 2) raffinement ; pour les procédures expérimentales de classes modérées et sévères des mesures d'anesthésie et un traitement analgésique seront systématiquement mis en oeuvre ; les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux. Par exemple le protocole d'irradiation comprendra une exposition unique (au lieu de plusieurs à dose inférieure) ; le nombre d'animaux utilisé pour l'élimination des cellules sénescents par voie chimique sera réduit par rapport à la technique utilisant des outils génétiques car cette technique est invasive. 3) remplacement ; les études *in vitro* ne permettent pas l'étude du microenvironnement tumoral pourtant essentiel dans l'étude de la sénescence, par conséquent le modèle murin reste approprié. En parallèle nous mettons en place au laboratoire la génération d'organoides dérivés de prélèvements de patients ou dérivés de tumeurs issues du modèle murin de GBM afin de limiter dans le futur le nombre d'animaux requis pour nos études.

11892 Le traitement du cancer du sein à l'aide d'anticancéreux présente de nombreux effets secondaires. Dans ce contexte, diminuer de la dégradation des anticancéreux (localement au niveau de la tumeur ou dans le foie) permettrait à la fois de diminuer les doses nécessaires en augmentant leur efficacité.

De manière surprenante, bien que la morphine, la codéine, le paracétamol et le tamoxifène possèdent un métabolisme commun et soient utilisés conjointement chez les patients, l'impact de

ces antalgiques sur la potentialisation et la dégradation de cet anticancéreux n'a jamais été étudié. Notre but est d'établir si la morphine et/ou codéine et/ou le paracétamol possèdent des effets bénéfiques ou négatifs à la fois sur la potentialisation et/ou sur l'inactivation du tamoxifène *in vivo*.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer : Les modèles de culture cellulaire se heurtent à une transposition dans des modèles intégrés. Dans notre cas, la notion de cancer est uniquement applicable dans un modèle intégré et donc chez un animal. C'est pour cette raison qu'une approche *in vivo* sur des souris est nécessaire.

Réduire : Un total de 120 souris C57BL/6J femelles sera utilisé lors de ces études. Ce nombre correspond au nombre minimal d'animaux par groupe permettant de mettre en évidence une différence statistique.

Raffiner : Les animaux sont placés en cage par groupe de 5 individus. Ils seront maintenus dans un environnement enrichi selon les procédures en vigueur à l'animalerie (barre de bois à ronger, nid) qui permet un bien être optimal des animaux (procédures en vigueur à l'animalerie). L'eau et la nourriture seront disponibles *ad libitum*. Les souris seront placées en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie contrôlée. Il n'est attendu aucun stress ni aucune douleur prolongée chez les animaux requis lors cette étude.

Un nombre total d'animaux à tester de 120 souris a été établi et se base sur les approches nécessaires au projet.

11893 L'Homme héberge et coopère avec un grand nombre de micro-organismes, appelés microbiotes, qui s'installent de façon progressive à partir de la naissance au niveau de la peau, des tractus respiratoire, intestinal et génital. Cette colonisation post-natale est importante pour la maturation immunitaire de nos tissus. Le projet propose de montrer que des bactéries primo-colonisatrices pourraient avoir la capacité de moduler la physiologie et l'immunité pulmonaire, et de préserver la santé respiratoire. Ce projet s'intéresse au cas particulier de l'asthme, un syndrome respiratoire résultant de dysfonctionnements immunitaires, d'altérations de la muqueuse et de perturbations des écosystèmes microbiens. Le traitement de l'asthme se fait par l'administration de corticostéroïdes, pour lesquels 10% des patients sont réfractaires et développent un asthme sévère. Par ailleurs, à haute dose, les corticostéroïdes entraînent des effets secondaires délétères comme un retard de croissance et un risque accru d'ostéoporose. C'est pour cette raison qu'il est important de développer de nouvelles alternatives thérapeutiques pour l'asthme, permettant de réduire l'utilisation des corticostéroïdes.

Parmi les bactéries microbiotes de l'Homme, *Enterococcus faecalis* est une espèce dominante après la naissance puis devient sous-dominante chez l'adulte. Il a été montré que son abondance dans les poumons des patients asthmatiques diminuait avec l'aggravation des symptômes. De plus, notre équipe a révélé qu'une souche d'*E. faecalis* présentait des activités anti-asthme. Toutefois, *E. faecalis* est une espèce bactérienne qui pourra difficilement être proposée sur le marché en tant que « bactérie vivante » car cette espèce n'a pas le statut QPS (« Qualified Presumption of Safety ») validant sa sécurité sanitaire. Le projet a donc pour objectif le développement d'une bactérie inactivée conservant les propriétés anti-asthme observées précédemment et la preuve de son innocuité. La première partie du projet n'impliquera pas d'expérimentation animale et permettra le développement de cette bactérie inactivée. Nous expérimenterons différents milieux de culture de la bactérie. Nous étudierons différentes techniques de dévitalisation (inactivation) de cette dernière permettant d'obtenir un produit sans risque de pathogénicité. Ces étapes utiliseront une validation sur des modèles *in vitro* (lignées cellulaires immortalisées). Dans une seconde partie du projet, nous devons vérifier l'innocuité et l'efficacité anti-asthme de la bactérie inactivée dans des modèles plus complexes, permettant l'exploration de la relation entre l'hôte, les bactéries et des allergènes. Nous utiliserons alors des souris C57BL/6, modèles courants pour l'étude de diverses pathologies respiratoires. Lors de la conception du protocole expérimental nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Le projet prévoit ainsi le recours à un minimum nécessaire de 603 souris. Tout d'abord, nous utiliserons des coupes de poumons (Procédure 1 *ex vivo*) pour évaluer les propriétés immuno-modulatrices

des bactéries. 15 souris adultes seront nécessaires pour cette partie. Cette étape permet de réduire le nombre d'animaux en permettant la réalisation de plusieurs coupes d'organes par animal et donc le test de plusieurs conditions de co-cultures avec un minimum d'animaux. Puis, la bactérie inactivée sera testée dans un modèle d'asthme induit par un broyat d'acariens (Procédure 2 *in vivo*). Nous comparerons l'effet de la bactérie inactivée sur les différentes caractéristiques de l'asthme, par rapport à la bactérie vivante, en comparaison ou en association avec un corticostéroïde. 220 femelles adultes dont 92 gestantes qui donneront 368 souriceaux seront nécessaires pour cette seconde partie du projet. Une première série d'expérimentations sera réalisée sur des souriceaux car des études ont permis de souligner que les stimuli bactériens durant la période néonatale peuvent influencer la sévérité de l'asthme. Un modèle d'asthme chez l'adulte sera aussi utilisé afin de déterminer si les effets de protection observés précédemment dans le modèle d'asthme chez les souriceaux sont présents chez l'adulte. Les souris recevront du broyat d'acarien (= House Dust Mite : HDM) ainsi que les bactéries par voie intra-nasale. Pour cela, nous appliquons une goutte de produit de 8µL (pour les souriceaux) ou de 30µl (pour les adultes) à l'entrée de la narine et le produit sera aspiré de façon naturelle par l'animal. L'expérimentation devra être répétée afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats et de s'affranchir des biais d'échantillonnage.

Pour favoriser le bien-être de nos souris, leur environnement est enrichi par l'ajout de mouchoirs en papier pour la nidification et de boîtes en carton où elles peuvent faire leur nid et se cacher. Pour limiter au maximum le stress et la douleur, des points limites sont clairement définis à l'avance. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement dès l'arrivée des animaux et tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

11894 Un nombre croissant de maladies humaines sont liés à l'équilibre du microbiote intestinal (maladies inflammatoires de l'intestin, diabète etc...). Le microbiote est composé de nombreuses espèces biologiques dont les plus abondantes sont les bactéries et les bactériophages. Ces derniers sont des virus qui s'attaquent exclusivement aux bactéries et qui sont très spécifiques des souches bactériennes ciblées. Les équilibres entre bactéries et bactériophages au sein du tube digestif et leurs conséquences sur la santé humaine sont mal comprises. Seules des études globales ont permis d'établir des corrélations entre des changements d'abondance et de diversité des bactériophages chez divers patients tels que ceux atteints de la maladie de Crohn. Une meilleure compréhension du rôle des bactériophages au sein du tube digestif permettrait de corriger les changements observés dans le but de développer des traitements.

Le microbiote intestinal est aussi le lieu où certaines bactéries pathogènes résident, attendant l'opportunité de provoquer des infections. Cette situation, dénommée portage asymptomatique, est responsable de nombreuses infections nosocomiales.

Enfin, les bactéries pathogènes étant de plus en plus résistantes aux antibiotiques, le traitement des infections bactériennes devient de plus en plus difficile.

De par leur capacité à tuer les bactéries, les bactériophages représentent un outil de choix pour cibler les bactéries au cœur du tube digestif. Cependant, les conditions et les conséquences à court et à long terme d'une telle approche ne sont pas connues et nécessite un travail expérimental qui requiert l'utilisation d'animaux équipés d'un tube digestif et d'un système immunitaire assez proche des êtres humains afin de fournir un contexte qui soit pertinent avec la future application des bactériophages en médecine humaine. Il n'existe aucun modèle alternatif qui puisse mimer le contexte intestinal à la fois microbien et tissulaire.

3360 souris, mâles et femelles âgées de 7 à 11 semaines seront utilisées sur 5 ans.

Le but recherché est l'identification des paramètres gouvernant l'activité des bactériophages dans le tube digestif ainsi que l'évaluation des conséquences de ces activités afin de définir leurs conditions d'utilisation à des fins thérapeutiques. Le traitement d'infections récalcitrantes aux antibiotiques ainsi que la réduction de désordres microbiens chez les patients sont des bénéfices attendus de l'utilisation thérapeutique des bactériophages.

Les animaux utilisés sont des souris qui hébergent une flore intestinale connue et contrôlée afin de permettre le suivi de chacune des souches bactériennes présentes et ses interactions avec les bactériophages. En contrôle, nous serons aussi amenés à utiliser des souris à flore conventionnelle et des souris axéniques (dépourvues de bactéries). Nous utiliserons 4 procédures expérimentales pour i) caractériser les souches bactériennes à étudier, ii) caractériser l'activité des bactériophages, iii) étudier les effets curatifs à court terme et iv) étudier les conséquences sur la stabilité des génomes des bactériophages à long terme. Pour chacune des souches bactériennes d'intérêt nous étudierons des bactériophages spécifiques préalablement caractérisés au laboratoire. Ce projet inclus 4 procédures dont 2 sont classées en sévérité légère (concernant 2724 souris) et 2 en sévérité modérée (concernant 636 animaux).

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience sera limité au strict nécessaire suivant les conseils d'un biostatisticien et au cours du développement de ce projet la taille des groupes contrôles au cours des répétitions sera réduite sans compromettre l'interprétation des résultats.

Le raffinement considéré consistera à renforcer la surveillance des animaux lors de l'utilisation de souches pathogènes afin de limiter leur éventuelle souffrance et de procéder le cas échéant à leur mise à mort.

11895 L'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive est une maladie génétique rare touchant moins d'une naissance sur 1 million. Elle est très grave. Elle est caractérisée par la formation généralisée de bulles et de cicatrices sur la peau et les muqueuses accompagnées de difformités sévères et d'une atteinte extracutanée majeure. La maladie est due à des mutations nulles du gène collagène VII (COL7A1) qui entraînent généralement un défaut de fonction du collagène VII, le constituant principal des fibrilles d'ancrage qui ancrent la membrane basale dans le derme. La maladie débute à la naissance ou pendant la période néonatale avec une formation généralisée de bulles. L'aplasie cutanée congénitale (absence congénitale de peau) peut aussi être observée à la naissance. Les bulles se résorbent avec la formation de grains de milium et de cicatrices atrophiques. Plusieurs types de traitements sont actuellement à l'étude pour lutter contre cette maladie : l'utilisation de greffes de peau génétiquement modifiée, l'injection de protéines ou de cellules cutanées saines, en vue de leur inclusion dans l'organisme du patient pour corriger les symptômes. Dans tous les cas, l'effet de ces traitements est limité dans le temps. Il faut les renouveler. Pour étudier l'efficacité et l'inocuité de ces nouvelles thérapies, nous avons besoin de réaliser des essais sur des cultures de peau, dans un premier temps, ce qui est tout à fait accessible. Par la suite, si les essais sont satisfaisants, nous devons tester ces traitements sur des modèles plus complexes, dont la peau des chiens en croissance, en contact avec d'autres organes, et dont la peau est en mouvement. C'est pourquoi nous devons travailler chez un animal vivant. Il existe des souris transgéniques porteuses de la maladie, mais il n'est pas possible de les utiliser pour essayer des traitements qui nécessitent une grande surface cutanée. Une maladie analogue par sa génétique et sa symptomatologie a été décrite dans plusieurs lignées de chiens de races. L'utilisation de ces chiens représente la seule possibilité sérieuse dont nous disposons pour tester des traitements à une échelle comparable à celle des enfants atteints. Nous avons donc développé un élevage d'une lignée de ces chiens, et nous incluons les chiots issus de cet élevage dans nos essais thérapeutiques en vue de les mettre en application par la suite chez l'Homme. Les traitements ne sont pas invasifs, ils consistent à appliquer des solutions, injecter des cellules par voie intraveineuse ou locale, ou réaliser des greffes de peau pour soigner la peau lésée. Tous les soins vétérinaires sont mis en oeuvre pour prendre en charge les symptômes de la maladie chez le chien, ainsi que les éventuels effets secondaires des traitements. Nous utiliserons, pour les 5 années qui viennent un maximum de 20 chiots. Seuls des chiots malades seront utilisés. Pour chaque essai, nous utilisons le nombre minimum de chiots nécessaires pour obtenir des résultats permettant l'application chez l'Homme. Les chiots qui naissent de notre élevage et qui ne sont pas porteurs de la maladie sont adoptés par des particuliers et mènent une vie de chiens de compagnie. En dehors des périodes de reproduction, les mères des chiots sont également placées dans des familles d'accueil.

11896 Nos modes de vie (diagnostics médicaux) et la survenue d'évènements exceptionnels, tels que des accidents nucléaires ou des attaques terroristes radiologiques, représentent un risque pour les populations exposées aux rayonnements ionisants (RI) qu'il est important d'évaluer. Il existe encore peu d'études sur les effets de ce type d'exposition, à doses faibles ou modérées, sur les fonctions cérébrales chez l'homme. Certaines d'entre elles suggèrent malgré tout qu'une exposition externe aux RI, au cours du développement du système nerveux central, pendant l'enfance, pourrait entraîner l'apparition de troubles cognitifs persistants à long terme chez l'Homme. Ce domaine de recherche a fait l'objet de peu d'études par la communauté scientifique. Le but de nos études expérimentales est d'améliorer nos connaissances scientifiques sur les troubles cognitifs susceptibles de survenir suite à une exposition externe du cerveau à des doses de RI faibles à modérées. Dans des projets précédents, les doses d'exposition auxquelles étaient soumises les souris étaient comprises entre 0.25 et 2 Gy. Les résultats obtenus démontrent une altération de la mémoire spatiale, en piscine de Morris, suite à la dose d'exposition de 1 Gy d'une structure de l'hippocampe, le gyrus denté. Ainsi, nous souhaitons dans ce projet réaliser d'autres tests de comportement de mémoire spatiale et non spatiale dans les mêmes conditions qu'un projet précédent pour compléter nos données.

Le test de mémoire qui sera mis en place permettra d'évaluer l'intégrité du fonctionnement de structures cérébrales (le cortex et l'hippocampe) et, plus précisément, d'un phénomène biologique, la neurogénèse adulte hippocampique, après exposition aux RI. Par la comparaison des résultats obtenus avec nos deux modèles d'exposition aux RI : un modèle d'irradiation du cerveau entier vs un modèle d'irradiation localisée du gyrus denté de l'hippocampe dorsal, le rôle spécifique de cette sous structure cérébrale (où se déroule la neurogénèse) dans l'apparition de troubles de la mémoire spatiale, après irradiation, pourra être évalué. Puis, toujours en utilisant en parallèle ces deux modèles d'irradiation, les effets directs et indirects des RI sur le gyrus denté pourront être décryptés. La dose d'exposition utilisée dans cette étude expérimentale ne doit pas engendrer de souffrance chez les animaux. Ils seront malgré tout observés quotidiennement afin de vérifier leur bien-être.

Pour la réalisation de cette étude 90 souris mâles âgées de 10 jours seront utilisées sur une période de 3 ans. L'utilisation d'animaux est indispensable à la mise en place de tests comportementaux permettant d'étudier les fonctions cognitives. L'approche expérimentale que nous souhaitons mettre en place nécessitera pour chaque dose d'irradiation l'utilisation de deux groupes d'animaux (champ large du cerveau vs irradiation stéréotaxique). Cette approche permettra de prendre en considération le fonctionnement intégré du cerveau dans l'apparition de ces troubles. De nouvelles réponses scientifiques quant aux mécanismes biologiques sous-tendant ses troubles ainsi que la manière dont les RI impactent le cerveau ou une sous structure cérébrale seront alors apportés. Afin de répondre au type de questions scientifiques soulevées dans ce projet, il n'existe pas de test *in vitro* substitutif. Dans l'objectif de répondre à l'exigence des 3R nous choisirons pour chaque expérimentation un nombre d'animaux permettant d'avoir une bonne puissance statistique pour obtenir des résultats scientifiques robustes sans avoir à effectuer de nouvelles expérimentations.

Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum l'inconfort ou le stress chez les animaux (suivi des animaux pendant et après les procédures, hébergement en groupe avec enrichissement, maintien au chaud des animaux suite à anesthésie).

11897 Chez l'homme comme chez certains animaux la leishmanie est responsable de parasitoses (les leishmanioses) présentant des manifestations cliniques cutanées ou viscérales, parfois mortelles en absence de traitement thérapeutique. Il n'existe à ce jour aucun vaccin et outre leur toxicité, les médicaments disponibles sont de moins en moins efficaces en raison notamment de l'apparition de parasites résistants vis-à-vis de ces traitements. Le développement de nouvelles thérapies préventives ou curatives dépend de la compréhension de la biologie de ce parasite complexe, et en particulier de la relation étroite qu'il met en place chez le mammifère avec sa cellule hôte le macrophage. Ce parasite a en effet développé des mécanismes d'adaptation lui permettant de se créer une niche à l'intérieur du macrophage dont il est capable d'affaiblir les défenses et de détourner certaines fonctions essentielles à son profit. Ainsi, une des thématiques du laboratoire

concerne l'étude des interactions entre la leishmanie et le macrophage, ce dernier provenant d'animaux de laboratoire.

Deux approches sont actuellement utilisées : d'une part une approche descriptive permettant de mieux définir et comprendre le statut permissif pro-parasitaire du macrophage infecté, statut imposé par le parasite et, d'autre part, une approche pharmacologique pour découvrir de nouveaux composés antiparasitaires agissant via la cellule hôte (thérapie dirigée via l'hôte).

Le projet actuel consiste en l'utilisation d'une population particulière de macrophages dits "inflammatoires" provenant du péritoine d'animaux de laboratoire ayant été inoculés avec une solution contenant un agent pro-inflammatoire. Les macrophages obtenus dans ces conditions, qui miment les conditions physiologiques présentes chez le mammifère lors du développement de la maladie, seront utilisés comme cellules hôtes pour les leishmanies. Des études cinétiques seront réalisées pour établir le profil phénotypique des macrophages infectés *ex vivo* et des tests pharmacologiques effectués pour déterminer l'efficacité des drogues antiparasitaires ainsi que leurs effets sur les macrophages.

Les procédures expérimentales sont simples et de sévérité légère, incluant une seule inoculation intrapéritonéale d'une solution de thioglycollate chez des souris ou des hamsters mis à mort 4 jours après. Aucun dommage n'est attendu sur cette courte période de temps et le comportement des animaux doit rester normal selon notre expérience de ce modèle. Les animaux seront néanmoins surveillés pour détecter au plus tôt tout signe d'inconfort, douleur ou stress de manière à intervenir aussitôt.

Un nombre limité de rongeurs femelles - 150 souris (procédure 1) et 30 hamsters dorés (procédure 2)- seront utilisés dans le cadre de ce projet prévu sur une durée de 3 ans. Ce nombre d'animaux a été calculé pour produire suffisamment de macrophages pour les expériences prévues *ex vivo*.

11898 La maladie de Crohn (MC), est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin, évoluant par poussées entrecoupées de périodes de rémission clinique, affectant principalement l'iléon terminal, le colon et l'anus. Elle se caractérise par un dysfonctionnement du système immunitaire sous l'influence de facteurs environnementaux chez des individus génétiquement prédisposés. La prévalence de la MC ne cesse d'augmenter, touchant actuellement 150 000 sujets en France. Il n'existe aujourd'hui que des traitements symptomatiques visant à prévenir les complications et/ou bloquer la progression de la maladie. L'activité physique ainsi que l'apport d'acides gras polyinsaturés n-3 via la graine de lin, dont les effets anti-inflammatoires ne sont plus à démontrer pourrait être utilisés comme traitement préventif primaire.

La composition microbienne intestinale constitue un écosystème complexe qui est aujourd'hui reconnu comme étant impliqué dans la santé de l'Homme. La MC résulterait d'une réponse immunitaire aberrante en réponse à une stimulation par le microbiote intestinal. Une rupture de l'homéostasie peut entraîner une réaction inflammatoire excessive et non contrôlée aboutissant à l'apparition de la MC, chez des individus génétiquement prédisposés et/ou sous influence de facteurs environnementaux. Les patients atteints de la MC sont caractérisés par une diminution de l' α -diversité du microbiote (nombre d'espèces coexistant dans un milieu donné) ainsi qu'un déséquilibre entre les bactéries pathogènes et bénéfiques que l'on appelle dysbiose.

Les études cliniques, épidémiologiques et expérimentales suggèrent que la MC serait une dysrégulation de la réponse immunitaire innée en réponse à un stimulus bactérien chez un hôte génétiquement prédisposé. Le modèle transgénique de souris utilisé dans cette étude mime la pathologie de la maladie de Crohn chez l'humain. Il en résulte le développement d'une inflammation intestinale similaire à celle observée chez des patients atteints de la MC. Une colite peut aussi être déclenchée par l'administration d'un composé chimique toxique, le sulfate de dextrane sodique (DSS). Après administration dans l'eau de boisson, l'activation du système immunitaire intestinal et le recrutement dans l'intestin de cellules inflammatoires concourent à entretenir l'inflammation et les lésions intestinales similaires à celles observées dans la MC.

Pour cette étude, 60 souris, souffrant d'inflammation intestinale chronique, âgés de 8 semaines seront réparties en différents groupes. Les animaux seront nourris avec un régime riche en lipides

complémenté ou non en acides gras polyinsaturés n-3. Cette complémentation sera directement intégrée dans l'alimentation, pendant 12 semaines. Les souris seront placées dans des cages individuelles avec des roues afin de suivre et mesurer l'activité physique spontanée. Suite au 12 semaines les souris seront traitées au DSS et infectées par une souche bactérienne pro-inflammatoire. L'objectif principal est de déterminer si l'activité physique spontanée et la complémentation en acides gras polyinsaturés n-3 ont un effet préventif primaire sur le statut inflammatoire, systémique et intestinal, lors d'inflammation aigue intestinale similaire à celle observée chez des patients de la MC. Dans un second temps, la variation du microbiote intestinal sera étudiée afin de déterminer le régime le plus efficient permettant de modifier favorablement le microbiote intestinal des souris. L'évolution du profil lipidique sera également évaluée.

La question se pose de savoir si un apport en acides gras polyinsaturés n-3, chez l'animal, associé à une d'activité physique spontanée (système ROUE), potentialiserait les effets attendus sur la composition corporelle, l'inflammation et le microbiote intestinal dans un contexte de MC.

Dans sa globalité, le projet de recherche proposé permettra d'identifier les moyens de faire évoluer les comportements vers des pratiques saines et durables et mettra à disposition des éléments pour orienter les politiques publiques et privées dans le but d'améliorer à la fois la santé et le bien-être des populations. Il permettra d'apporter de nouveaux éléments visant à terme à déterminer l'impact de l'environnement et des pratiques sociétales sur le microbiote intestinal et sur la santé humaine et à proposer des alternatives inédites aux traitements biologiques.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) pour l'expérimentation animale. Afin de comprendre les mécanismes adaptatifs au complément et/ou l'activité physique spontanée, nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation *in vitro*, *ex vivo* ou *in-silico*. Le nombre d'animaux par lot est toutefois limité au maximum (à partir d'un test de puissance en lien avec la littérature). Les souris (n=60) seront mises en cage individuelle dans un environnement enrichi dès leur arrivée (roue ou balle en inox suivant le groupe). Bien que l'isolement induise un stress sur l'animal, il est nécessaire pour cette étude pour le suivi hebdomadaire de la prise alimentaire et surtout le suivi de l'activité physique spontanée. Toutefois, les cages seront transparentes et collées les unes aux autres ainsi elles permettront aux animaux de se voir et se sentir.

Aucune procédure très douloureuse n'est prévue mais si besoin nous mettrons en œuvre des méthodes permettant de limiter au maximum toute éventuelle souffrance de nos animaux (mise en place de points limites, utilisation de cages adaptées et surveillance quotidienne des animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins ou d'exclusion d'animaux en souffrance).

11899 L'exposition à la fumée de cigarette et aux polluants comme l'ozone est un facteur majeur dans le développement de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Cette pathologie est caractérisée par une inflammation anormale des voies respiratoires, une difficulté respiratoire et une altération progressive des parois alvéolaires (emphysème).

L'objectif du projet est d'étudier le rôle des acteurs impliqués dans les réponses inflammatoires et immunitaires pulmonaires déclenchées par l'exposition à la fumée de cigarette, la pollution comme l'ozone. Pour comprendre l'importance de ces protéines, nous étudierons le déroulement de la maladie chez des souris déficientes pour les gènes correspondants. Les modèles murins sont en effet des outils précieux pour tester les nouvelles stratégies thérapeutiques en phase préclinique, qui ne sont pas réalisables chez l'homme. Ces travaux ont fait l'objet d'un article dans un journal international à comité de lecture, publié et mis à la disposition de la communauté.

Le projet s'est poursuivi et étendu à d'autres polluants environnementaux comme les particules de diesel, les microplastiques et les pesticides et à l'étude d'autres voies impliquées dans les réponses inflammatoires.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 sauvage ou génétiquement modifiée ne présentent pas d'immunodéficience forte ; cependant les souris déficientes sont plus susceptibles aux pathogènes et sont maintenues dans un environnement avec un statut sanitaire de type EOPS (Exempt organismes pathogènes spécifiques).

L'exposition à la fumée de cigarette, à l'ozone ou aux polluants peut causer une gêne respiratoire avec perte de poids passagère.

Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation va dépendre des résultats obtenus et du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 60 études/an, soit au maximum 2832 souris par an et 14160 souris au total sur 5 ans.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation qui nécessitent plusieurs niveaux d'interactions entre système immunitaire et voies aériennes notamment, et ne peuvent être reproduits *in vitro* ou *in silico*. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : chaque procédure sera suivie quotidiennement pour s'assurer du bien-être des animaux et éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. Si des animaux montrent des signes de souffrance (point limite : perte de poids supérieure ou égale à 20% et/ou score (décrit en paragraphe 3.4.13) égal ou supérieur à 4, ils seront mis à mort.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

11900 Les maladies métaboliques du foie représentent plusieurs syndromes qui vont de la simple stéatose hépatique à la stéatose hépatique inflammatoire pouvant évoluer vers la fibrose, la cirrhose et le cancer hépatocellulaire. La stéatose hépatique est très fortement associée à l'obésité, la glucotoxicité, la résistance à l'insuline et au diabète de type 2. Les voies métaboliques, qui peuvent conduire au stockage excessif de lipides dans le foie, sont multiples et peuvent être liées à une augmentation exacerbée de la lipolyse adipocytaire, de la synthèse de novo des acides gras par la voie de la lipogénèse ainsi qu'à une réduction conjointe de la β -oxydation des acides gras. Dans ce projet, nous caractériserons des modèles de souris génétiquement modifiés et/ou exprimant de manière ciblée dans le foie des cibles moléculaires données dans le but d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la stéatose hépatique et des syndromes qui lui sont associées. De plus, le foie stéatosé, en condition d'obésité et de résistance à l'insuline, voit son fonctionnement altéré au niveau de son métabolisme mais aussi de son sécrétome. Le concept d'hépatokines est très récent et notre projet vise également à caractériser les hépatokines connues pour leurs effets sur le métabolisme énergétique et la sensibilité à l'insuline mais aussi à identifier de nouvelles hépatokines. Les hépatokines pouvant être soit bénéfiques soit délétères, elles pourraient être le chaînon manquant entre la stéatose et la résistance à l'insuline. Dans ce contexte, nous utiliserons des lignées de souris génétiquement modifiées dont le phénotype n'est pas dommageable. Pour développer une stéatose hépatique, les souris seront nourries avec différents types de régimes stéatogènes et nous analyserons l'impact des changements des paramètres métaboliques en réalisant des tests fonctionnels majoritairement peu invasifs. Le nombre de souris utilisées pour ce projet sera de 940. Nous serons très attentifs à ce que notre démarche expérimentale soit en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Concrètement, les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement pensés et élaborés afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Nous nous attacherons également à limiter au maximum la souffrance et le stress infligés aux souris, une surveillance journalière des animaux sera réalisée en respectant des points limites bien définis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. De plus, tout au long de cette étude, nous réévaluerons la possibilité de faire appel à des méthodes alternatives et des modèles *in vitro* afin de limiter au maximum l'utilisation d'animaux. A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la stéatose

hépatique, la glucotoxicité, la résistance à l'insuline et aideront à la caractérisation et/ou l'identification d'hépatokines clefs du contrôle du métabolisme énergétique.

11901 La lamproie fluviatile (*Lampetra fluviatilis*) est une des trois espèces de lamproies européennes, toutes protégées au titre de la directive habitat faune flore 92/43/CEE. La préservation de cette espèce est fortement liée à son succès reproducteur, lui-même potentiellement conditionné par l'adéquation entre son comportement de reproduction (creusement du nid, accouplement) et son habitat de reproduction en rivière (taille du substrat, vitesse du courant) qui peut être altéré par les activités humaines (barrages, recalibrage des cours d'eau). L'objectif de l'expérience proposée est de tester l'adaptation du comportement de reproduction à l'habitat de reproduction. Cependant, l'observation fine du comportement de cette espèce est difficile en milieu naturel, donc l'expérience proposée se déroulera en conditions expérimentales, dans un aquarium de 10 m de long et un mètre de large, où un flux d'eau de 0.3 m/s sera généré et où la taille du substrat sera manipulée selon deux modalités : fine (gravier, sable) et grossière (caillou, gravier). Soixante lamproies fluviatiles provenant du milieu naturel seront réparties en deux lots de 30 individus (15 femelles + 15 mâles), anesthésiés par balnéation, marquées individuellement avec une pâte élastomère de couleur injectée en trois points devant la nageoire dorsale (combinaison de couleurs unique pour chaque individu), et placées dans deux sections de 5 m de l'aquarium dont le fond offrira un substrat soit grossier soit fin. Leur comportement de creusement de nid et d'accouplement sera enregistré en continu grâce à des caméras, et les œufs qui dériveraient hors des nids seront collectés sur des grilles de nylon d'un millimètre de maille situées à l'aval de chaque section. L'hypothèse testée ici est que le comportement reproducteur, et notamment le nombre d'individus impliqués dans chaque acte reproducteur, peut influencer l'éjection des œufs hors du nid, différemment selon le substrat de ponte. Le remplacement par un modèle de simulation ou par une autre espèce n'est pas envisageable ici, car l'objectif est précisément d'étudier le comportement reproducteur de cette espèce en particulier. L'effectif de 60 individus, soit 15 femelles + 15 mâles pour chacune des deux modalités de substrat permet a priori d'observer un nombre suffisant d'actes reproducteurs pour conduire une analyse statistique. De plus, cet effectif de 15 femelles + 15 mâles reproduit une expérience déjà menée sur la lamproie de Kessler en 2017, avec laquelle nos résultats seront comparés. Enfin, les conditions d'hébergement des lamproies seront adaptées de manière à ressembler au maximum à leurs conditions de vie naturelle : une surface de 5 m² pour 30 individus, ce qui correspond à la densité à laquelle cette espèce grégaire est observée dans la nature lors de la reproduction ; un substrat graveleux plus ou moins grossier ; un constant flux d'eau de rivière (aquarium alimenté en circuit ouvert par de l'eau de rivière et mis en mouvement grâce à une hélice), une photopériode mimant la photopériode naturelle. Les adultes de cette espèce ne s'alimentent pas. La surveillance des paramètres physico-chimiques de l'eau et les observations quotidiennes du comportement permettront de réagir rapidement. Dans le milieu naturel, les lamproies fluviatiles meurent peu après la fin de la reproduction, en général dans un état physiologique critique. En fin d'expérience, les individus seront anesthésiés puis euthanasiés par surdose d'anesthésiant.

11902 Les maladies chroniques, maladies dites non transmissibles, tuent chaque année plus de 40 millions de personnes dans le monde (71% des décès ; www.who.int). Parmi celles-ci, les maladies cardiovasculaires (MCV) sont les plus mortelles (env. 18 millions de décès/an). Au-delà des facteurs de risque comportementaux (sédentarité, tabagisme, alcool...), les MCV ont bien souvent pour origine des perturbations du métabolisme des lipides (comme l'hypercholestérolémie) et des sucres (comme le diabète). À côté de l'hypertension artérielle, l'obésité et la maladie du foie gras (i.e. la NAFLD englobant la stéatose non alcoolique (NAFL) et son évolution inflammatoire, la stéatohépatite (NASH) sont des facteurs de risque majeurs des maladies cardiovasculaires. Ces conditions sont également très liées puisque la NAFLD est la manifestation hépatique la plus commune de l'obésité.

Les macrophages sont des cellules du système immunitaire présents dans tous les tissus. Ils participent au maintien de l'homéostasie de l'organisme en éliminant notamment les cellules mortes ou bien des pathogènes (bactéries). Ces cellules ont toutefois été aussi fortement impliquées dans

un grand nombre de maladies chroniques, où on leur prête bien souvent un rôle délétère, et notamment dans la NAFLD en tant que médiateurs de l'inflammation. Bien que ces macrophages constituent une famille bien établie de cellules de l'immunité innée, il y a une grande diversité au sein des macrophages que ce soit d'un tissu à l'autre mais également au sein d'un même tissu. Cette hétérogénéité est aussi fortement dépendante et influencée par l'environnement, notamment métabolique.

Notre projet vise à mieux définir le rôle des macrophages dans le développement de ces pathologies dites cardio-métaboliques en étudiant très précisément les macrophages du foie. Pour cela, l'utilisation du modèle de la souris reste incontournable car il va nous permettre d'invalider ou d'induire l'expression de gènes spécifiquement dans cette population de macrophages. Pour reproduire les différents contextes pathologiques ces modèles animaux seront nourris avec différents types de régimes alimentaires qui favorisent la survenue d'obésité ou bien de la NAFLD ou bien encore de l'hypercholestérolémie. Nous évaluerons ensuite dans chaque modèle l'évolution de la pathologie (examen de la stéatose hépatique et de l'inflammation, évolution de l'insulino-résistance, impact sur les pathologies cardiovasculaires telle l'athérosclérose, prise de masse grasse). Ainsi, en modifiant la fonction de ces macrophages ou bien même en éliminant ces cellules du foie de manière momentanée ou durablement, nous essaierons de comprendre leurs rôles et l'importance de leur diversité (origine, activation), cela au sein même du tissu (interactions avec les autres cellules du tissu), dans le contexte de la pathologie et des perturbations métaboliques qui favorisent son développement.

Ce programme de recherche est développé dans le respect de la règle des 3R. Il est tiré profit de chaque animal pour nous apporter le maximum d'information. Si possible, nous utiliserons les données de manière transversale entre les protocoles afin de réduire le nombre d'animaux. Lorsque cela est possible techniquement, sans affecter la qualité des données recueillies, les modèles de souris partageant un même groupe contrôle seront étudiés en même temps afin de réduire le nombre d'animaux. L'approche de croisement pour produire les animaux génétiquement modifiés est optimisée pour que tous les animaux produits soient utilisés. La taille des groupes expérimentaux a également été optimisée afin de répondre aux besoins de mettre en évidence des différences statistiques et pour prendre en compte les variations liées à la diversité de la réponse biologique. Enfin, nous améliorons au maximum nos méthodes et procédures opératoires pour limiter la détresse et la souffrance des animaux (surveillance, période d'acclimatation lors d'un changement d'environnement, hébergement en groupe sauf cas spécifique requis pour une procédure, anesthésie gazeuse pour tout prélèvement ou injection, points limites définis en amont des procédures, procédures d'euthanasie appropriées).

Considérant l'ensemble des procédures, la diversité des protocoles expérimentaux et le nombre de modèles génétiques, le nombre d'animaux utilisés sera de 2412 souris sur 5 ans.

11903 L'autisme (ou troubles du spectre autistique – TSA) est un trouble du développement caractérisé par une interaction sociale altérée, une communication perturbée, ainsi que la présence de comportements restreints et répétitifs. Le Syndrome de Rett (SR), pathologie d'origine génétique, présente également des composantes de type autistique importantes. Nous souhaitons analyser et comprendre comment les malformations/anomalies à l'origine des pathologies neurodéveloppementales sont générées, ainsi que la façon dont les réseaux neuronaux sont altérés durablement, avec l'hypothèse que ces altérations commencent in utero et/ou à la naissance dans le SR. Notre objectif est d'améliorer notre compréhension des modifications présentes dans les neurones de type « autistes » dans le modèle murin du SR.

Pour ce projet, nous allons utiliser des souris génétiquement modifiées pour inactiver le gène MeCP2. Ces souris présentent des symptômes qui rappellent les troubles décrits chez les patients atteints du syndrome de Rett, et donc un phénotype dommageable. En effet, ces souris présentent des difficultés respiratoires sévères, des problèmes de locomotion, ainsi qu'une perte de poids (à partir de 30 jours postnatal (P30) pour les mâles et P180 pour les femelles).

Ce projet a été planifié pour appliquer au mieux les principes de réduction et de raffinement permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Concernant le remplacement, les études que

nous proposons se focalisent sur l'organisation des réseaux neuronaux que ne peut être reproduite ni étudié dans des modèles de cultures cellulaires *in vitro*. De plus, les souris transgéniques permettent de réaliser des expériences sur des modèles de maladies comme le SR.

Pour le maintien de la colonie de souris SR, nous utiliserons les femelles bien avant l'apparition des symptômes de la maladie, et des souris mâles sauvages (non génétiquement modifiés). Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement via la mesure de leur poids ainsi que l'observation de leur aspect et comportements. Si nécessaire, des mesures seront prises pour réduire leur stress et leur douleur. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux en cages équipées, en plus de l'enrichissement de base (maison en carton pour rongeurs qui permet aux animaux de dormir et se reposer, en plus de participer à leur exercice physique : grimper et explorer) et de matériaux de nidification.

Nous démarrerons la colonie de souris SR avec 12 femelles. Sur une période de 4 ans, nous générerons 1380 souriceaux et utiliserons 12 mâles pour les accouplements (soit au total 1404 animaux). Les souriceaux générés seront ensuite utilisés pour un projet scientifique qui sera sujet à une autre demande d'Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques.

11904 Les néoplasies myéloprolifératives (NMP) sont des cancers du sang caractérisé par une hyperproduction de cellules sanguines. Cette augmentation est due à une mutation dans les cellules de la moelle osseuse. Les complications thrombotiques, c'est-à-dire l'obstruction d'une veine ou d'une artère par un caillot sanguin, sont la principale cause de décès des NMP. La thrombose veineuse cérébrale (TVC) se traduit par l'obstruction d'une veine du cerveau par un caillot sanguin. Il s'agit d'une localisation rare de thrombose représentant 0.5 à 1% des accidents vasculaires cérébraux. Les autres situations favorisant la survenue de TVC sont la grossesse, la prise de contraceptif et les cancers.

Le traitement anticoagulant a pour but de fluidifier le sang afin d'éviter des lésions cérébrales, responsables d'un éventuel handicap et du décès. Cependant, une inefficacité de ce traitement est rapportée chez les patients avec une TVC associée à une NMP. Notre but est d'identifier les mécanismes impliqués dans cette résistance.

Nous faisons l'hypothèse que la physiopathologie de la thrombose impliquée dans les TVC associées aux NMP est différente de celle observée dans les TVC liées à d'autres causes.

A cette fin, il est nécessaire de disposer de modèles animaux pertinents mimant au plus près la pathologie humaine. Nous mettrons au point un modèle de thrombose veineuse cérébrale que nous réaliserons chez des souris porteuses du gène muté responsable de NMP comparativement à des souris non mutées.

A J1 et J5 post-chirurgie, nous rechercherons et quantifierons la présence de lésions cérébrales secondaires à la thrombose par une technique non invasive d'imagerie à résonance magnétique. La présence d'un déficit neurologique chez les souris sera évaluée avant la chirurgie, à J1 et J5 post-chirurgie à la recherche d'un déficit moteur, de la sensibilité ou d'un trouble de l'équilibre. A J5 post-chirurgie, les souris seront sacrifiées. La présence et la taille des lésions cérébrales seront évaluées par une analyse des tissus cérébraux. En complément, nous mesurerons des paramètres biologiques à la recherche d'une activation des plaquettes, des globules rouges et des globules blancs pouvant favoriser la formation de la thrombose ou son aggravation. Dans ce projet, nous nous consacrerons uniquement à l'étude de la phase aiguë de la TVC correspondant chez l'homme aux 15 jours suivant la survenue de la thrombose cérébrale.

Le modèle de souris présentant la mutation responsable des NMP a déjà été développé au sein de notre unité. Il permet d'obtenir des souris développant spontanément une hyperproduction de globules rouges pouvant entraîner des troubles de la coagulation facilitant les thromboses. Il s'agit donc de souris avec un phénotype dommageable pour lesquelles la définition de points limites a été réalisée afin de réduire la souffrance des animaux. Ainsi, un suivi quotidien par du personnel qualifié sera réalisé avec un examen clinique des animaux à la recherche d'une perte de poids, d'un saignement, ou de lésions cutanées pouvant nécessiter un sacrifice de l'animal. Les douleurs post-opératoires seront prises en charge par des antalgiques.

L'utilisation d'animaux est justifiée par le fait que le modèle décrit dans ce projet mime parfaitement la pathologie humaine avec une grande reproductibilité et correspond à l'introduction de la mutation présente chez les patients. De plus, le modèle décrit inclut une évaluation neurologique c'est-à-dire l'étude du retentissement clinique des lésions cérébrales (trouble moteur/sensitif/équilibre) non réalisable *in vitro*.

Le nombre total de souris nécessaires à ce projet est de 250 sur une période de 4 ans.

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, réduction et de raffinement (3R) :

-Remplacement : une étude clinique sera préalablement réalisée sur des prélèvements de patients atteints de TVC liée à une NMP. Elle permettra de guider les paramètres biologiques d'intérêt à doser chez la souris après validation du modèle.

-Réduction : Les différentes expérimentations animales ont été consciencieusement élaborées afin de réduire le nombre d'animaux utilisés tout en permettant la mise en place d'un modèle reproductible efficace de thrombose veineuse cérébrale.

-Raffinement : L'ensemble de la procédure expérimentale, et autres manipulations nécessitant une immobilisation seront conduites sur animaux anesthésiés pour réduire la souffrance, la douleur, l'angoisse. Tous les animaux seront euthanasiés 5 jours après l'induction de la thrombose cérébrale. Les prélèvements de tissus seront réalisés ensuite.

11905 L'hémostase des mammifères résulte d'une évolution extrêmement sophistiquée qui a élaboré une cascade de complexes (pro) enzymatiques destinés à apporter une réponse rapide aux lésions des vaisseaux, ainsi que le développement d'un système cellulaire dédié et spécialisé mettant notamment en jeu les plaquettes et l'endothélium. Les deux systèmes ont développé des mécanismes de contrôle spécifiques pour prévenir une réactivité excessive. Il est cependant évident que des échanges altérés entre les principaux acteurs peuvent jouer un rôle dans la pathogenèse des troubles de la coagulation, le désordre (athéro)-thrombotique et l'inflammation. Cette connaissance est primordiale pour le diagnostic et l'élaboration de thérapies, comme par exemple pour l'hémophilie une maladie congénitale entraînant un défaut de la coagulation sanguine.

Une des protéines clés de l'hémostase, notamment de la coagulation sanguine est le facteur X (FX). Au cours de ce processus, le facteur X est activé en enzyme (FXa). Le FXa catalyse la conversion de la prothrombine en thrombine et occupe donc un rôle pivot dans la cascade de la coagulation. En effet la thrombine est l'enzyme qui par son action directe sur différents acteurs protéiques (fibrinogène, cofacteurs V et VIII, facteur XIII...) et cellulaires comme les plaquettes va permettre la formation et la consolidation du thrombus ou clou plaquettaire au site de lésion vasculaire. La position centrale et spécifique du FX (action uniquement sur la prothrombine) dans le processus de coagulation a conduit plusieurs groupes à définir le FXa comme cible thérapeutique idéale pour contourner la coagulation défectueuse chez les patients hémophiles. Cependant, en raison des propriétés inhérentes à l'enzyme, celle-ci a une efficacité limitée car une fois introduite dans la circulation, elle est rapidement inactivée par des inhibiteurs plasmatiques endogènes tels que l'Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) et l'antithrombine (AT). De fait, la demi-vie estimée du FXa libre dans le plasma est inférieure à 2 min. En outre, il a été montré qu'un variant du FXa qui échappe à l'inhibition pourrait potentiellement augmenter le risque de complications thrombotiques. Dans une tentative de contourner ces limitations, plusieurs stratégies de dérivation hémostatique basées sur des formes recombinantes modifiées de FXa ou FX ont été développées avec divers degrés de succès. Une des limites au développement de telles thérapies à base de FX est due à un manque de connaissance du fonctionnement de la protéine dans un contexte *in vivo*. En effet, si les relations structure-fonction du FX au cours de l'hémostase ont été intensivement étudiées *in vitro*, la biologie de la protéine et son activité enzymatique *in vivo* restent largement inexplorées. Une des raisons de ce manque d'information réside dans le fait qu'aucun patient homozygote pour la délétion du gène F10 codant pour le FX n'a été signalé (cf. base internationale de données des patients avec déficit en FX, [http : //www.hgmd. cf.ac.uk/ac/index.php](http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php)). De plus,

l'inactivation du gène F10 chez la souris est associée à une létalité *in utero* ou quelques jours après la naissance suggérant qu'un déficit complet en FX est incompatible avec la vie.

Pour mieux comprendre la biologie du FX et en particulier son rôle *in vivo* dans l'hémostase, nous proposons d'utiliser un modèle viable unique d'inactivation conditionnelle du gène F10 développé à partir de souris C57BL/6. Nous visons à étudier comment une carence en FX affecte le recrutement des composants majeurs du thrombus, à savoir la fibrine, les plaquettes, les globules rouges et les leucocytes. Ensuite, dans les limites de la détection par imagerie microscopique, nous tenterons de visualiser la présence de FX, seul et associé à ses partenaires de coagulation. Cela ne caractérisera pas seulement le FX *in vivo* mais nous permettra de valider divers variants moléculaires de FX développés pour traiter l'hémophilie.

Nous souhaitons utiliser le modèle de formation de thrombus induite par une blessure au laser sur le muscle crémaster car ce modèle expérimental se distingue des autres modèles que nous avons jusqu'à maintenant utilisés (section de l'extrémité de la queue de souris ou section d'une veine ou d'une artère caudale à un diamètre de queue précis). En effet, ce modèle ne met pas en jeu le sous-endothélium lors de la formation du thrombus. Il nous permet donc de distinguer la contribution du FX présent dans le plasma de celle du FX extravasculaire dans la formation du thrombus plaquettaire.

Dans le but de respecter la règle des 3R, les souris sont hébergées par groupe de maximum de 5 individus avec comme enrichissement du coton pour nidification ou des dômes. L'hébergement est réalisé dans une pièce avec une température et une hygrométrie contrôlée, avec un rythme circadien respecté. Les animaux seront acclimatés à leur nouvel environnement au moins 7 jours avant toutes expérimentations. La totalité des expérimentations sera effectuée par du personnel compétant. Les expérimentations de microscopie intravitale sont des expérimentations sans réveil, et sont réalisées sous anesthésie générale injectable (ketamine /Xylazine/atropine). Les animaux sont maintenus sous anesthésie profonde durant toute l'expérimentation puis euthanasiés par un excès d'anesthésique. Le nombre de souris a été calculé au plus juste pour obtenir une différence significative. Dans un souci d'utilisation d'un nombre minimal d'animaux, le nombre total d'animaux annoncé (12 animaux) pourra ne pas être atteint sur l'année du projet. En effet si une différence significative entre les différents lots testés est atteinte avant d'avoir inclus tous les animaux, les autres animaux ne seront pas inclus dans cette étude.

11906 La prématurité est la principale cause de décès et de handicaps chez les nouveau-nés. Dans les pays industrialisés, en raison de l'amélioration des soins intensifs néonataux, le nombre des nourrissons de très faible poids de naissance qui survivent au-delà de l'enfance est en hausse. Cependant, le cerveau de ces prématurés reste extrêmement vulnérable. Les lésions diffuses de la substance blanche (LSB) constituent la principale forme de lésion cérébrale du prématuré même si certaines lésions de la substance grise (LSG) peuvent également survenir. L'inflammation périnatale que subit dans 20 à 40% des cas les enfants prématurés et la grande vulnérabilité des cellules cérébrales en développement à ce stress inflammatoire est à l'origine de l'apparition de la plupart de ces lésions. Elles induisent des handicaps moteurs, des déficits cognitifs et des troubles comportementaux qui persistent à l'âge adulte qui sont regroupées sous le terme d'Encéphalopathie du Prématuré (EDP). Malheureusement, aucune thérapie spécifique à l'EDP n'existe à ce jour. L'amélioration du pronostic de cette pathologie repose donc sur la découverte de nouvelles stratégies neuroprotectrices. Nous proposons donc l'utilisation du LP-211 comme molécule neuroprotectrice. Nous avons montré précédemment que cette molécule diminuait *in vitro* la neuroinflammation, cependant il est nécessaire de passer *in vivo* pour pouvoir déterminer si cela corrige les déficits cognitifs associés à l'EDP. Les objectifs de ce projet visent alors (1) à déterminer l'impact du LP-211 sur les processus neuroinflammatoires et (2) à évaluer l'efficacité de cette molécule sur les LSB et les déficits cognitifs liés à l'EDP. Pour cela, nous utiliserons un modèle de EDP induit par des injections de molécules inflammatoires (IL1b) chez le souriceau vigile qui reproduit la pathologie humaine de l'enfant prématuré. Dans ce modèle largement utilisé, il sera étudié l'évolution des processus neuroinflammatoires, des altérations du développement cérébral et des déficits cognitifs sous traitement au LP-211 à différents stades du développement dans nos

4 groupes : contrôle (CTR), LP-211, IL1b, IL1b + LP-211. Les expériences seront réalisées chez 378 souris sur une période de 5 ans. La bonne reproductibilité et le faible taux de mortalité (5%) de ce modèle expérimental permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques. Ce modèle expérimental qui repose sur des injections intra-péritonéales d'IL1b et du LP-211 est de sévérité légère et n'entraîne pas de phénotype dommageable chez la souris. La mise en place de points limites (anémie, déshydratation, absence de prise de poids, lésions) ainsi que l'observation quotidienne et approfondie du comportement des animaux permettront d'identifier et de limiter toute souffrance et douleur.

Cette étude prendra en compte la réglementation des 3R :

Remplacement : Une partie des travaux de ce projet a déjà été réalisée *in vitro* sur des cultures cellulaires. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'EDP mettent en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires au cours du développement cérébral qu'il est impossible de reproduire *in vitro*.

Réduction : Le nombre d'animaux estimé et les tests statistiques utilisés sont basés sur notre expérience pour ce type d'étude. L'analyse statistique de nos données nécessite n=20 animaux par groupe pour mettre en évidence une différence significative total= 378.

Raffinement : Les injections se feront en intra-péritonéale. Les animaux seront remis dans leur nid et on vérifiera quotidiennement que le retour au sein du nid se fait bien. Des grilles de scoring seront proposées en fonction de l'âge des animaux déterminants ainsi les points limites prédictifs. Si les points limites sont atteints, les animaux concernés seront mis à mort. Les animaux seront hébergés en groupe en milieu enrichi pour minimiser leur stress. A la fin de l'étude les animaux seront sacrifiés selon les méthodes réglementaires

11907 La nécessité d'évaluer la sécurité des médicaments est apparue suite aux accidents thérapeutiques du début du XXème siècle voire aux tragédies comme ce fut le cas pour la thalidomide.

Dans ce cadre, l'étude de l'index thérapeutique et de l'innocuité d'une molécule est primordiale. Il s'agit de déterminer les doses à administrer afin d'obtenir la concentration sanguine permettant l'effet recherché mais également d'évaluer la dose à laquelle les premiers effets secondaires apparaissent. Ces études sont fréquemment réalisées sur des rongeurs et pourraient être également considérées comme l'équivalent préclinique des études de phase 1 en développement clinique impliquant des volontaires sains.

Dans ce projet nous adressons 3 questions interdépendantes.

- La première interrogation est de savoir comment le composé se comporte vis-à-vis de l'organisme : comment il y entre, à quelle vitesse, combien de temps il reste avant d'être éliminé et où il va. C'est ce qu'on appelle l'étude des paramètres pharmacocinétiques. Pour cela le composé est administré à différentes doses, puis du sang et/ou des organes sont prélevés à différents moments après l'administration. La détermination de la dose de composé dans le sang ou dans chaque organe par analyse chimique permet de calculer les paramètres pharmacocinétiques d'intérêt.

- Ce projet permet également d'évaluer les éventuels effets secondaires d'une molécule lors de son administration aux doses que l'on souhaite utiliser pour traiter la maladie (doses thérapeutique). Pour cela, des animaux sains sont traités par le composé à tester et leur comportement est observé pour détecter des effets non souhaités comme des somnolences, des hyperactivités (mesure de l'activité locomotrice spontanée dans un espace ouvert sans contrainte) de la défaillance de coordination motrice (évaluation de la capacité à marcher sur une barre ou à se maintenir sur un cylindre en rotation à vitesse fixe et adaptée au rongeur) ou de la force musculaire (évaluation de la capacité d'agrippement et mesure électromyographique).

- Finalement, ce projet permet de déterminer la fenêtre thérapeutique d'une molécule en déterminant la dose d'apparition des effets indésirables. Ceci est réalisé en administrant un composé à une dose supérieure à la dose thérapeutique et à étudier leur comportement pour détecter des effets non souhaités comme des somnolences, des hyperactivités (mesure de l'activité locomotrice spontanée dans un espace ouvert sans contrainte) de la défaillance de coordination

motrice (évaluation de la capacité à marcher sur une barre ou à se maintenir sur un cylindre en rotation à vitesse fixe et adaptée au rongeur) ou de la force musculaire (évaluation de la capacité d'agrippement et mesure électromyographique).

Dans le cadre du respect de la règle des 3R,

Remplacement : aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. En effet, les processus étudiés impliquent des interactions multiples et complexes. De plus, les effets secondaires sont par nature imprévisibles.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesures sont mises en œuvre notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, une visite quotidienne, une anesthésie gazeuse pour les procédures induisant un stress, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

Réduire : nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 10 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 2 880 rats est envisagée.

11908 Conscient de l'intérêt majeur de la vaccination pour la santé publique, le présent projet vise à évaluer l'impact d'une déficience du processus autophagique dans les cellules de la lignée myéloïde sur la bio-persistance, la translocation et la toxicité des particules aluminiques utilisées comme adjuvant dans 2/3 des vaccins. Bien que la vaccination soit une avancée majeure de la médecine moderne, une défiance croissante de la population vis-à-vis de la vaccination a émergé depuis quelques années. En cause, les crises sanitaires (Médiator, sang contaminé, etc.), les soupçons de collusion entre autorité de santé et industrie du médicament sous l'effet de scandales médiatisés et la question de l'innocuité des adjuvants vaccinaux.

L'adjuvant vaccinal le plus utilisé dans la vaccination humaine est aujourd'hui l'hydroxyde d'aluminium (Al(OH)₃). Hors, les mécanismes par lesquels ce sel d'aluminium stimule la réponse immunitaire reste encore largement incompris et il pourrait, chez des personnes prédisposées, être à l'origine de troubles chroniques. En effet, certains sujets vaccinés présentent une persistance anormalement longue de l'aluminium au niveau du site d'injection, ce qui est associée à des douleurs musculaires et articulaires, un état d'épuisement chronique et des troubles mentaux invalidants. Ces symptômes, ainsi que la présence de particules d'aluminium au niveau du site de vaccination, permettent de diagnostiquer une condition pathologique appelée la Myofasciite à Macrophages (MFM). L'analyse génétique de 365 patients MFM a démontré la présence de mutations ponctuelles sur plusieurs gènes majeurs de l'autophagie, le mécanisme de détoxification majoritaire de l'aluminium, avec un effet cumulatif de ces mutations. Les études antérieures réalisées chez la souris indiquent que l'adjuvant est déplacé du muscle où il a été injecté, d'abord vers les ganglions lymphatiques et la rate puis vers la circulation sanguine, avec une accumulation retardée et progressive dans le cerveau. L'hypothèse de travail retenue est que le défaut d'autophagie dans les cellules monocytaires pourrait être à l'origine d'une translocation des particules aluminiques du site d'injection vers le cerveau où les effets neurotoxiques de l'aluminium conduiraient aux troubles observés chez les patients MFM.

Notre but est de comprendre l'implication de l'autophagie dans les mécanismes de transport de l'adjuvant vaccinal depuis le muscle injecté jusqu'au cerveau et l'effet de l'accumulation cérébrale de cet adjuvant par le suivi du composé injecté, l'évaluation de l'inflammation produite, la mesure de la concentration en aluminium cérébrale et l'observation de la réponse comportementale associée, chez 596 souris ATG5 déficientes mâles et femelles nées à l'animalerie et âgées de 2 mois en début d'expérimentation. L'analyse des deux sexes est primordiale dans l'étude de ce syndrome à dominante féminine (70-80%). La souche de souris C57BL/6J Atg5^{flox/flox} a été sélectionnée dans le but de produire des individus ne présentant pas d'expression pour le gène

Atg5 (gène majeur de l'autophagie) dans la lignée myéloïde. L'utilisation d'animaux ne peut être substituée par une étude *in vitro* dans la mesure où l'étude de la distribution systémique d'un agent pharmacologique ne peut s'effectuer que sur les organismes entiers.

2 procédures seront mises en place dans cette étude. La première comprendra 20 animaux sur une durée de 21 jours. 2 doses d'adjuvant (200 et 400 µg Al/kg) seront injectées respectivement à chaque groupe composé de 5 animaux Atg5 KO et 5 contrôles. Cette procédure permettra de contrôler les caractéristiques génétiques de nos souris ainsi que l'impact de ces caractéristiques sur l'autophagie. Elle nous permettra également de sélectionner la dose d'adjuvant la plus adaptée pour la procédure 2. La procédure 2 sera une étude sur 2 mois de 576 souris réparties en 4 traitements (témoins, adjuvant, adjuvant couplé à un traceur et vaccin total) étudiés à trois temps différents (7, 21 et 60 jours après l'injection) pour un total de 12 animaux par groupe, par sexe et par génotype. Aux différentes durées après l'injection d'adjuvant, le groupe correspondant sera mis à mort afin de prélever plusieurs organes (muscle injecté, ganglions de drainage, rate et cerveau). Les différents organes nous permettront d'observer le parcours de l'adjuvant dans l'organisme ainsi que l'impact de sa présence, notamment dans le cerveau, par une étude de l'inflammation produite et d'évaluer le rôle de la génétique sur ces facteurs.

Les principes de remplacement, réduction et raffinement ont été pris en compte pour construire les protocoles expérimentaux de ce projet. Le nombre d'animaux a été calculé afin de garantir une exploitation statistique des données obtenues par des tests non-paramétriques. La procédure 1 a été construite afin de réduire par deux le nombre d'animaux nécessaire lors de la réalisation de la procédure 2. Pour le bien-être des animaux, une unique injection intra-musculaire sera pratiquée et des points limites ont été intégrés au protocole pour limiter le stress et la souffrance des animaux. La vaccination des souris ne génère a priori pas d'effets dommageables évidents, ceux-ci pouvant être comparés à ceux occasionnés chez l'homme, à savoir un éventuel état fébrile temporaire. Le milieu sera enrichi par l'apport de matériel pour construire un nid, et l'hébergement sera assuré en groupe pour permettre aux animaux d'exprimer un comportement social naturel. Notre protocole expérimental ne comprend pas de procédure a priori douloureuse mais les animaux seront suivis quotidiennement afin de suivre leur bien-être.

A terme, l'étude de la relation entre déficience en autophagie et bio-persistance/translocation des particules aluminiques vaccinales permettra un progrès scientifique sur une maladie de faible prévalence tout en augmentant la masse de données disponibles sur la sécurité des adjuvants aluminiques en accord avec les recommandations du rapport de l'Académie Nationale de Pharmacologie de 2016 ainsi que celles de l'OMS concernant la sécurité vaccinale.

11909 Les séquelles osseuses post-traumatiques ou post-chirurgicales posent des problèmes difficiles en raison notamment de l'importance du défaut osseux à réparer. Les greffes osseuses sont d'usage fréquent et l'autogreffe est la technique de référence. Les principales limites de cette technique sont la nécessité de deux opérations (prélèvement puis greffe), la faible quantité d'os disponible et la morbidité liée au prélèvement (suites post-opératoires et complications potentielles). La régénération osseuse guidée est une technique chirurgicale issue de l'ingénierie tissulaire utilisant des biomatériaux sous forme de membrane jouant un rôle de barrière en empêchant l'envahissement du défaut osseux par les tissus mous de recouvrement (peau, muqueuse, muscle) et favorisant ainsi indirectement la cicatrisation osseuse. Ces membranes peuvent être utilisées seules ou associées à des greffes osseuses ou d'autres biomatériaux de substitution osseuse. De nombreuses membranes sont actuellement commercialisées. Leurs principales limites sont leur manque de propriété ostéogénique, leur manque de tenue mécanique et un risque accru d'infection du site opératoire. C'est pourquoi la recherche est active pour développer des membranes permettant d'étendre les indications chirurgicales et/ou d'améliorer les résultats obtenus avec ces biomatériaux.

Ce projet de recherche a pour objectif d'étudier l'efficacité de nouvelles membranes fabriquées au laboratoire sur la repousse osseuse. Les études *in vitro* préalablement effectuées ont permis de sélectionner des membranes présentant un potentiel thérapeutique important (ostéorégénérateur, antimicrobien). Leur innocuité a été testée. Mais la complexité des systèmes physiologiques mis en

place *in vivo* lors de la cicatrisation osseuse ne permet pas l'utilisation de méthodes alternatives pour évaluer leur comportement et leur efficacité au sein d'un organisme complet. Pour cela, l'utilisation d'un modèle animal est un préalable préclinique impératif pour envisager une application en clinique humaine. Le modèle choisi est le modèle de résection osseuse au niveau de la voûte du crâne (modèle de calvaria). Il s'agit d'un modèle très souvent employé pour l'étude préliminaire de nouveaux biomatériaux destinés à la régénération osseuse. Afin d'obtenir des résultats exploitables scientifiquement en utilisant le nombre le plus faible d'animaux, des analyses intermédiaires à 6 et 8 animaux/groupe seront réalisées avant d'augmenter le nombre d'individu à 10 animaux/groupe, le projet portant sur un nombre maximal de 50 rats.

L'expérimentation sera réalisée dans le respect des textes réglementaires relatifs à la protection et à l'utilisation des animaux de laboratoire. Le projet s'inscrit dans une démarche éthique suivant la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) en optimisant les conditions de vie, d'hébergement et de soins des animaux. Les dommages associés à la craniotomie seront minimisés par la réalisation d'une chirurgie mini-invasive et par le respect de la suture sagittale médiane.

La procédure et la gestion post-opératoire des animaux tiennent compte des points limites et du bien-être des animaux. Ainsi, toutes interventions seront effectuées sous anesthésie générale et des antidouleurs seront utilisés de façon comparable aux prises en charges chirurgicales humaines.

A terme, ce projet scientifique pourrait mener au développement d'un nouveau biomatériau sous forme de membrane utilisé dans la régénération du tissu osseux et améliorer la prise en charge chirurgicale des patients.

11910 Les pathologies cardio-vasculaires (PCV) sont devenues la plus grande cause de décès dans le monde dans la dernière décennie. En 2015, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait à 17.7 millions le nombre de décès lié aux MCV dans le monde et ce chiffre devrait atteindre 23.6 millions en 2030. Plusieurs pathologies comme l'hypertension et l'infarctus du myocarde favorisent le développement de l'insuffisance cardiaque (IC). L'IC est une pathologie chronique, fréquente et grave puisqu'elle touche 2.3 % soit 1 130 000 de français et constitue la troisième cause de mortalité cardiovasculaire après les accidents vasculaires cérébraux et les infarctus du myocarde. Cette forte mortalité liée à l'IC constitue un véritable problème de santé publique. Elle est la première cause d'hospitalisation chez les personnes de plus de 65 ans, ce qui représente un impact économique important. L'IC se définit par une difficulté du cœur à assurer un débit sanguin suffisant pour répondre aux besoins des différents organes vitaux. Le développement de l'IC est un processus lent qui s'accompagne d'un stress myocardique (tissus cardiaque) qui initie des modifications structurelles appelées remodelage, dont le but est de normaliser la fonction cardiaque. Le remodelage cardiaque se manifeste principalement par des modifications de la taille et de la forme du cœur. L'insuffisance cardiaque est considérée comme compensée si le processus de remodelage permet une fonction cardiaque normale. En revanche, lorsque le stress se prolonge et que les mécanismes compensatoires sont dépassés, le remodelage initial devient maladaptatif entraînant une dysfonction cardiaque aboutissant à l'insuffisance cardiaque « c'est la phase décompensée ». À l'échelle tissulaire, le remodelage s'accompagne d'une hypertrophie des cardiomyocytes (cellules musculaires cardiaques), ainsi qu'une modification de leur support, la matrice extracellulaire (MEC). L'ensemble de ces processus est dû à la réponse inflammatoire de l'organisme au stress myocardique. Un des acteurs essentiels au développement de cette réponse inflammatoire est le Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 (TREM-1). TREM-1 est une protéine présente à la surface de différents types cellulaires. Il joue un rôle important dans l'amplification de la réponse inflammatoire. Plusieurs travaux précliniques ont clairement montré d'une part l'implication forte de TREM-1 et d'autre part l'effet bénéfique de son inhibition via un immunomodulateur de la voie de TREM-1 dans le processus inflammatoire aiguë de l'insuffisance cardiaque ischémique. Afin d'évaluer son impact dans les processus chroniques conduisant à l'IC, nous souhaiterons évaluer l'implication de TREM 1 et son inhibition pharmacologique ou génétique au cours d'un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque. Plusieurs approches seront utilisées afin d'étudier l'expression de TREM-1, les profils inflammatoires, les marqueurs de l'inflammation, la fonction cardiaque et enfin la survie. Les expériences seront réalisées en respect de la règle des

3R : Réduction : le nombre total de souris adultes utilisées dans ce projet est estimé à 216. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus, tout en garantissant une puissance statistique suffisante. Raffinement : les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Les animaux bénéficieront d'une intervention chirurgicale brève sous anesthésie générale permettant le développement d'une insuffisance cardiaque chronique (procédure sévère). Un suivi régulier par échocardiographie sera réalisé pour évaluer la fonction cardiaque des animaux. 8 semaines après la chirurgie, l'ensemble des animaux seront mis à mort par forte dose de pentobarbital avant le prélèvement sanguin et du cœur qui seront analysés pour répondre aux objectifs de l'étude (procédure sans réveil). Le bien-être animal sera une des priorités de l'expérimentation. Les animaux seront hébergés en portoir avec des cages ventilées et filtrées, à 5 souris par cage, dans des cages de 500 cm². Notamment, nous veillerons à l'enrichissement du milieu de vie (tunnels de polycarbonate, buchettes en peuplier.). Enfin, les points limites ont été déterminés a priori. Remplacement : l'utilisation d'animaux est rendue nécessaire par l'absence de modèle *in vitro* ou de possibilité de modélisation *in silico*.

11911 Les ions métalliques sont impliqués dans de nombreux processus biologiques fondamentaux et sont des éléments essentiels pour la croissance et le développement de tous les organismes vivants. Les cellules régulent étroitement l'accumulation, le transport, la distribution et l'exportation de métaux, et une mauvaise régulation de la quantité d'ions métalliques peut être signe de pathologie comme les maladies cardiaques, le cancer et les maladies neurodégénératives.

Le zinc revêt un intérêt particulier car il s'agit d'un micronutriment essentiel requis pour plus de 300 processus cellulaires différents, notamment l'activité enzymatique, la synthèse de l'ADN et des protéines et la signalisation cellulaire. Il est connu que la carence en zinc entraîne une augmentation du stress oxydatif contribuant à des maladies telles que les cancers. La teneur en zinc est particulièrement importante dans la prostate, le sein mais surtout le pancréas. Tous ces organes libèrent des ions zinc avec d'autres molécules en réponse à des stimuli externes. Par exemple, le zinc est relargué avec l'insuline en cas de stimulation par injection de glucose. Une mauvaise régulation du zinc a été clairement associée aux cancers du pancréas, de la prostate et du sein, même si son rôle n'est pas complètement compris. Il est donc clair que la détection du zinc par des techniques non invasives telles que l'IRM est essentielle pour améliorer la détection précoce du cancer.

Nous travaillons avec des chimistes qui ont mis au point un agent de contraste détectable en IRM sensible au zinc. Après complexation avec le zinc présent au niveau du pancréas il va s'ensuivre une baisse du signal sur l'image au niveau du pancréas.

Notre objectif est d'obtenir une preuve de concept de la détection IRM de Zn²⁺ *in vivo* dans le milieu extracellulaire après sa libération, stimulée par le glucose par exemple. La teneur en Zn²⁺ dans les organes est comprise entre le mM et le μM en fonction leur de l'état physiologique ou pathologique. Cette gamme est parfaitement détectable par IRM.

Deux séries de souris seront utilisées : des souris wild type C57BL/6JRj et un modèle de souris diabétiques chez lesquelles il y a moins de zinc dans le pancréas que les souris wild type. Ce modèle déjà décrit dans la littérature sera obtenu par injection de streptozotocin (STZ) à des doses inférieures au seuil de toxicité. Ces souris diabétiques ont une dérégulation de la production d'insuline par les cellules β quantifiable car liée au zinc qui sera lui détecté par l'agent de contraste.

Des IRM de pancréas avec injection d'un agent de contraste sensible au zinc seront réalisées *in vivo* chez des souris témoins et diabétiques (STZ) après induction d'une hyperglycémie (injection IV de glucose) afin de voir si cet agent est capable de détecter une anomalie au niveau de la sécrétion d'insuline et donc du zinc. Si l'agent est efficace, le signal détecté au niveau du pancréas ne doit, en toute rigueur, pas être le même pour les souris wild type et les souris STZ.

Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude préclinique en particulier d'induction du diabète ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés scrupuleusement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles.

L'intérêt de l'IRM réside aussi dans le fait qu'une même souris peut être observée plusieurs fois dans le temps et donc d'utiliser moins d'animaux.

120 souris seront utilisées dans l'étude

11912 Les infections intra mammaires, ou mammites, représentent une pathologie inflammatoire fréquente en élevage laitier, et affectent directement la santé et le bien-être de l'animal, la qualité du lait et la réussite économique des élevages. La maîtrise des mammites représente donc un enjeu majeur pour la filière. En particulier, après le vêlage, l'augmentation de la production laitière et le bilan énergétique négatif des vaches laitières conduisent à une mobilisation des réserves adipeuses et la fonction immunitaire est impactée. Des travaux rapportent des associations entre des facteurs nutritionnels et physiologiques (dépression immunitaire après la mise bas) sur la sensibilité des ruminants aux mammites. Mais les mécanismes sous adjacents et leur régulation et leur contrôle restent méconnus.

Dans ce projet nous chercherons à préciser l'impact des facteurs nutritionnels (apports énergétiques notamment) pour permettre l'évaluation de la réponse inflammatoire locale et systémique chez des vaches laitières en début de lactation. L'objectif général est d'étudier les mécanismes qui modulent les réponses inflammatoires des ruminants laitiers.

Pour atteindre cet objectif, nous utiliserons 24 vaches laitières en fin de gestation et début de lactation qui seront réparties en 2 lots homogènes de 12 vaches chacun. Tous les animaux recevront des régimes utilisant des aliments conventionnels en élevage. Pour tester les effets d'une variation d'ingestion d'aliment, les 12 vaches d'un premier lot recevront un régime dilué en utilisant un aliment encombrant (paille d'orge) pour réduire la densité énergétique du régime, tout en conservant une ingestion à volonté. La durée de cette restriction partielle sera au maximum de 7 jours, et débutera après la 3ème semaine de lactation. Le second lot sera le lot contrôle sans changement de régime. Après 5 jours de distribution des régimes alimentaires différents, tous les animaux seront soumis à une épreuve inflammatoire intra-mammaire, et feront l'objet d'un suivi clinique, d'un suivi de la production de lait, d'examen sanguins et d'analyses du lait, et d'études sur des tissus cibles pertinents (glande mammaire, tissu adipeux et foie).

Les attentes de ce projet sont d'améliorer notre connaissance des facteurs de modulation de la réponse inflammatoire, notamment l'impact des facteurs d'élevage sur la capacité des vaches laitières à répondre à une inflammation. L'ambition de ce projet est d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes sous-jacents et de développer des stratégies pour prévenir l'apparition de mammites, en particulier pendant la période critique périnatale.

Concernant l'application du principe des 3R. En effet, il n'existe pas de modèle *in vitro* ou *in silico* pouvant se substituer au modèle animal. De plus, le choix de l'espèce est imposé par l'étude spécifique des inflammations mammaires (mammites). L'utilisation de 24 vaches laitières est nécessaire car elles présentent des spécificités biologiques centrales pour cette recherche. Le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour étudier les adaptations physiologiques pendant la période postpartum, caractérisée par une forte variabilité individuelle et constituent un nombre minimal pour fournir des données exploitables sur le plan statistique. L'inflammation provoquée ne sera ni de forte (dose inférieure à celle décrite dans certains articles) ni de longue durée (un seul challenge) et sera suivie par les critères tels que l'ingestion, la production, la rumination, la température. De plus les méthodes appliquées seront des méthodes alternatives par rapport aux analyses conventionnelles (utilisation d'un automate pour les analyses plasmatiques ce qui réduit la quantité de sang nécessaire pour les dosages et mise en œuvre d'analyses transcriptomiques permettant l'obtention de plusieurs milliers de données d'expression génique à partir d'un seul prélèvement).

Cette expérimentation a été précédée par une étude pilote pour affiner les niveaux de restriction alimentaire nécessaires à induire des différences suffisantes entre les deux lots.

11913 L'objectif du projet est d'étudier le rôle des cellules du sang (hématopoïétiques), par rapport aux cellules constituant les tissus (non hématopoïétiques), dans la réponse immunitaire. Pour ce faire, on réalise une transplantation de moelle osseuse. Après irradiation pour éliminer les cellules hématopoïétiques, les souris reçoivent une injection par voie intraveineuse de cellules de moelle osseuse, qui contiennent des cellules souches qui vont permettre de reconstituer tout le système hématopoïétique de manière durable. Ceci est vérifié par le comptage des cellules sanguines, réduite après irradiation, mais revenues à la normale 8 semaines environ après reconstitution par les cellules de moelle osseuse. On appelle ces animaux des 'chimères' puisqu'ils contiennent les tissus du receveur et les cellules sanguines et hématopoïétiques issues du donneur de moelle osseuse. Un animal donneur permet de reconstituer une vingtaine d'animaux receveurs, en leur transférant les caractéristiques du donneur spécifiquement dans les cellules sanguines.

Le modèle murin de génération de chimères par transplantation de moelle osseuse permet d'étudier les cellules circulantes et cellules constitutives. Des souris de type sauvage et déficientes pour des gènes de la réponse immunitaire seront utilisées. Les lignées indiquées ne présentent pas d'immunodéficience forte ; cependant les souris déficientes sont plus susceptibles aux pathogènes et sont maintenues dans un environnement avec un statut sanitaire de type EOPS (Exempt organismes pathogènes spécifiques).

La compréhension de ces mécanismes permettra d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques pour améliorer les traitements de pathologies inflammatoires infectieuses ou non.

Les cellules du compartiment hématopoïétique, peuvent être éliminées par irradiation corporelle totale, encore appelée radiothérapie. Par la suite une greffe de moelle osseuse est réalisée à partir de la moelle osseuse d'une souris donneuse différente. Cette technique est utilisée chez l'Homme dans le traitement de leucémies. Comme chez l'Homme, l'irradiation peut entraîner des effets secondaires. Chez la souris le pelage peut devenir gris après plusieurs semaines et on note une perte de poids par conséquent une surveillance quotidienne des animaux est réalisée dès leur arrivée. La reconstitution est effective 8-10 semaines après le transfert de moelle osseuse. Avant cela, les animaux n'ont pas de cellules hématopoïétiques fonctionnelles. Par conséquent, les animaux sont très sensibles aux infections et doivent être manipulés le moins possible. La perte de poids ne sera donc mesurée qu'une fois par semaine pour limiter le risque de contamination. Des points limites prédictifs, autres que la pesée, sont mis en place quotidiennement pour détecter une douleur ou souffrance éventuelle comme l'aspect et le comportement de l'animal. Ces points limites sont détaillés dans le paragraphe 3.4.13.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation. Ce projet sera réalisé dans un souci de respecter la règle des 3R :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, plusieurs niveaux de complexité sont nécessaires, impliquant des interactions entre différents types cellulaires et organes, qui ne peuvent être développés *in vitro* ou *in silico*.

Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur et le stress au moment de l'expérimentation. Si des animaux présentent des signes de souffrance (point limite : perte de poids supérieure ou égale à 20% et/ou score (décrit en paragraphe 3.4.13) égal à 4, ils seront mis à mort.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles. Pour chaque procédure 52 souris seront utilisées au maximum. Uniquement les expériences pertinentes seront répétées 3 fois avec des animaux de groupes équivalents de plusieurs expériences indépendantes pour qu'elles soient considérées comme valides pour la publication scientifique. Pour ce projet 936 souris au maximum seront utilisées durant toute la durée des 3 ans (52 souris x 6 génotypes x 3 répétitions = 936 souris maximum).

11914 A l'heure où l'antibiorésistance est une menace, la solution pourrait venir du monde microbien lui-même. L'exploration des microbiotes dans différents contextes a révélé un rôle insoupçonné de ces communautés microbiennes sur la physiologie et la santé de l'hôte, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles stratégies pour le maintien de la santé humaine et animale. Ce projet vise à explorer le dialogue entre le microbiote et différents acteurs cellulaires de la glande mammaire bovine et fait l'hypothèse que ce microbiote (dans son ensemble ou certaines composantes) est susceptible d'influencer la santé et la physiologie de la mamelle. Les approches métagénomiques ont en effet révélé un lien entre la composition et la richesse de ce microbiote et l'état sanitaire de la mamelle.

Le projet a pour objectif de développer les outils *ex-vivo* nécessaires à l'exploration de ces interactions et d'évaluer l'influence du microbiote sur la réponse immunitaire innée en intégrant différents types cellulaires présents dans la mamelle, la barrière épithéliale ou bien encore la fonctionnalité des cellules épithéliales. Ces travaux apporteront les résultats préliminaires permettant de valider notre hypothèse et d'amorcer l'exploration du rôle du microbiote mammaire (ou de certaines composantes telles que les bactéries lactiques) sur la santé de la mamelle. Ces modèles *ex vivo* permettront d'apporter des éléments de réponse sans pour autant, dans un premier temps, avoir recours à de l'expérimentation *in vivo*. Ces modèles seront développés à partir de trois types de prélèvement : du lait de mélange (pour l'isolement de différents types cellulaires présents dans le lait (cellules épithéliales et immunitaires), du lait de premier jet et du lait citernal (pour l'isolement du microbiote du lait), du sang (pour l'isolement de cellules du système immunitaire). Ces prélèvements seront répartis sur 3 ans, sur un nombre maximum d'animaux évalué à 72 au total.

L'objectif du projet est, in fine, de proposer des stratégies d'orientation du microbiote mammaire bovin vers un microbiote bénéfique pour la santé, permettant de réduire la prévalence des mammites et donc le recours à l'antibiothérapie, dans une logique d'amélioration du bien-être et de la santé des vaches laitières.

Les modèles développés pourront également être mis à profit pour l'étude des interactions entre certains pathogènes majeurs responsables de mammites, tels que *Staphylococcus aureus*, et les acteurs cellulaires de la réponse immunitaire de la mamelle, afin de mieux comprendre les mécanismes infectieux de ces pathogènes.

Remplacement : il n'est pas possible de réaliser cette étude autrement que sur vaches en lactation.

Réduction : le nombre d'animaux sera adapté à la mise au point méthodologique. Nous privilégierons les prélèvements sur le lait (méthode non invasive d'étude des cellules mammaires)

Raffinement : la conduite d'élevage sera une conduite classique respectueuse du bien-être des animaux avec du personnel habilité à expérimenter sur animaux. Chaque procédure de prélèvement d'échantillons biologiques (sang et lait) sera accompagnée par une procédure adaptée et un suivi du comportement des animaux.

11915 L'ADHD (Attention-deficit/hyperactivity disorder) est un trouble neurodéveloppemental fréquent caractérisé par l'apparition des symptômes d'inattention et d'hyperactivité-impulsivité. L'ADHD peut également affecter le contrôle inhibiteur, la mémoire de travail, la planification et le processus de récompense. En effet, des études récentes soulignent l'hypersensibilité à la douleur chez l'adulte atteint d'ADHD et suggère une comorbidité possible de l'ADHD et de la douleur.

Le cortex cingulaire antérieur (ACC) est une des structures cérébrales majeures qui participent au contrôle des voies descendantes vers la moelle épinière impliquées dans la modulation du transfert de l'information douloureuse dans la corne dorsale de la moelle épinière. Par conséquent, nous émettons l'hypothèse d'une éventuelle implication de l'ACC dans les mécanismes à l'origine des dysfonctionnements des contrôles descendants (projections de neurones du cerveau vers la moelle épinière) chez les patients atteints du syndrome ADHD.

Cependant, l'étude des réseaux neuronaux impliqués dans les interactions entre l'ADHD et la douleur ainsi que les mécanismes sous-jacents restent encore peu étudiés. Le but de notre projet est de comprendre, chez un modèle animal d'ADHD, les mécanismes à l'origine des effets croisés entre ces deux pathologies.

Dans cette étude, la réduction du nombre d'animaux est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique (hétérogénéité inter-individuelle), le nombre de souris utilisées dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas ainsi 12 animaux par groupe. La réalisation de ce projet dans son ensemble nécessite l'utilisation de 84 souris SWISS. Le recours au modèle animal est indispensable car ce projet demande une évaluation comportementale et aucun modèle *in vitro* (cellules ou tissus) ne peut reproduire les conditions des pathologies étudiées. Dans toutes les procédures où cela sera possible, un antalgique sera donné. Pour les autres procédures, les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne renforcée, et les points limites définis permettront de maîtriser cette douleur.

11916 Les infections mycobactériennes, comme la tuberculose, représentent un des plus graves problèmes de santé publique globale, également récurrent en Europe. Récemment des souches multi-résistantes aux antibiotiques se sont répandues, notamment dans plusieurs pays d'Europe de l'Est, jusqu'en Allemagne et en France. L'arsenal d'antibiotiques disponibles étant limité et parfois inefficace, d'autres pistes de thérapies adjuvantes faisant appel au système immunitaire sont à l'étude. Les liens entre le système immunitaire du patient et le contrôle de l'infection a notamment été mis en évidence lors des premiers traitements de pathologies inflammatoires sévères (comme la polyarthrite rhumatoïde) par des anticorps neutralisant une hormone du système immunitaire (la cytokine TNF) qui ont conduit des réactivations de tuberculose. Nous essayons de comprendre les liens de cause à effet mis en jeu afin de les utiliser pour améliorer la lutte contre l'infection.

Un des thèmes de recherche développés par l'équipe de recherche est l'étude de la réponse immunitaire de l'hôte aux infections par les mycobactéries. Nous travaillons chez la souris, dont la génétique est la mieux connue, notamment pour la création d'animaux transgéniques, essentiels pour les expériences envisagées. Le laboratoire dispose de souris transgéniques déficientes pour des cytokines ou des récepteurs ou des gènes impliqués dans les voies de signalisation qui, si elles montrent une réponse modifiée, permettent de valider l'implication de ces gènes dans la réponse de l'hôte à l'infection. Notre objectif est d'approfondir cette étude démarrée en 2012 notamment par l'étude de délétion des gènes étudiés au niveau de types cellulaires spécifiques, afin de mieux comprendre le rôle du système immunitaire dans les mécanismes de défense et dans la pathogenèse liée à ces infections. In fine, notre objectif est d'identifier des cibles et de proposer de nouvelles méthodes thérapeutiques permettant de mieux contrôler ces infections chez les patients. Les avantages et dommages attendus sont le contrôle de l'infection par les souris sauvages, alors que les souris plus sensibles pourront développer une infection non contrôlée avec perte de poids qui fait l'objet d'un point limite spécifique.

Dans un souci d'appliquer la règle des 3 R, nous étudions l'activation par les mycobactéries de types cellulaires isolés en culture *in vitro*. Cependant, la réponse de l'hôte à l'infection par les mycobactéries fait intervenir un réseau complexe de cellules et de facteurs solubles pulmonaires qui ne peut pas être reproduite *in vitro* dans son ensemble. Des groupes de 5 animaux par condition et point d'observation seront utilisés de façon à limiter le nombre de répétitions de chaque procédure expérimentale tout en ayant un nombre suffisant d'individus pour valider statistiquement les résultats obtenus. En effet le modèle ne montre pas de variabilité nécessitant des lots de plus de 5 animaux. De plus, nous utilisons un même groupe contrôle pour plusieurs groupes de souris étudiées.

Le nombre d'animaux en expérimentation est limité au minimum nécessaire pour déterminer la significativité statistique des résultats, un même groupe contrôle de souris sauvage étant utilisé pour plusieurs groupes mutants ou traités. Il est prévu de faire 8 expériences par an, typiquement comprenant chacune 1 groupe contrôle et 3 groupes tests, à 3 temps d'analyse, soit 60 souris par expérience, 480 souris par an et un total de 1440 souris sur 3 ans pour la procédure 1 d'infection à *M. tuberculosis* et 4 expériences par an, typiquement comprenant chacune 1 groupe contrôle et 3 groupes tests, à 2 temps d'analyse, soit 40 souris par expérience, 160 souris par an et un total de 480 souris sur 3 ans pour la procédure 2 d'infection à *M. bovis* BCG. Soit un total de 1440 + 480 = 1920 souris sur 3 ans.

Dans un souci de bien-être des animaux, des anesthésiques/analgésiques seront utilisés pour réaliser certains types de traitements pour limiter la douleur chez l'animal. De plus, la surveillance des animaux est réalisée quotidiennement et consiste en l'observation de l'aspect général de l'animal, de son comportement et de sa mobilité. Une prise de poids est réalisée 2 fois par semaine ou plus fréquemment si besoin. Si des animaux présentent un début de signes de souffrance (point limite prédictif : perte de poids supérieure ou égale à 20% et/ou score de 4 (décrit en paragraphe 3.4.13), ils seront mis à mort. Les analgésiques ne sont pas administrés car ils peuvent influencer les résultats expérimentaux, car ils peuvent interférer dans le système immunitaire.

11917 L'imagerie photoacoustique (IPA) offre aujourd'hui la possibilité d'imager optiquement les tissus en profondeur, avec la résolution de l'imagerie échographique. Dans cette technique non invasive, de la lumière est délivrée par un laser sous forme d'impulsions courtes et du son est généré par les absorbeurs optiques présents dans les tissus. Cela permet de former des images à contrastes moléculaires à des profondeurs bien plus importantes que des méthodes optiques. Ces contrastes ont de nombreux intérêts en imagerie clinique ou pré-clinique. La résolution de la technique, identique à celle de l'échographie, reste limitée par diffraction ultrasonore.

Notre but est de construire des approches d'IPA super-résolue et de s'approcher des résolutions optiques. Nos collaborateurs ont déjà fait des démonstrations de plusieurs techniques de super-résolution grâce à un dispositif immergé. Ils ont récemment mis au point un dispositif d'imagerie PA qui peut être appliqué directement sur la peau d'un animal, sans immersion. Leurs méthodes peuvent donc être appliquées *in vivo* pour obtenir des images super-résolues de la vascularisation dans plusieurs organes.

Notre premier objectif est de caractériser l'instrument prototype en utilisant l'imagerie PA conventionnelle. Pénétration, contraste, résolution et sensibilité seront analysés dans différents tissus et organes chez la souris. Notre deuxième objectif est d'établir des preuves de concept d'imagerie super-résolue *in vivo*. La réalisation de ces 2 objectifs permettra dans le futur, la construction de projets tournés vers des problématiques bio-médicales.

Un premier groupe de 15 souris sera nécessaire pour caractériser l'instrument sur les tissus de l'abdomen (foie, rate, reins...). Un second groupe de 10 souris pour l'imagerie du cœur et un dernier groupe de 15 souris pour l'imagerie du cerveau. Au total 40 souris seront nécessaires.

Remplacer :

A ce stade du projet, tous les tests *in vitro* sur fantômes ont été effectués, il est indispensable de caractériser l'instrument sur un organisme vivant. Le modèle murin nous semble le plus approprié.

Réduire :

De nombreux tests *in vitro* nous ont permis de réduire un maximum le nombre de possibilités pour se concentrer sur un nombre réduit de tests *in vivo*. De plus, l'approche statistique et l'expérience de l'équipe dans ce domaine, nous permet de réduire le nombre d'animaux au minimum afin d'obtenir des résultats exploitables.

Raffiner :

Afin d'employer au mieux les animaux, les protocoles présentés ont été optimisés afin d'obtenir le maximum d'informations sans augmenter la douleur infligée aux animaux. En effet, toutes les procédures possiblement traumatisantes sont effectuées sous anesthésie gazeuse, avec une gestion de la douleur adaptée à chaque situation.

11918 Le but de ce projet est dans un premier temps de valider la mise en place des différentes procédures expérimentales envisagées dans un protocole de caractérisation du métabolisme chez le Rat, au sein de notre institut.

Ensuite, nous lancerons un protocole pilote pour définir les valeurs classiquement observées dans l'enchaînement de tests que nous prévoyons sur le fond génétique utilisé.

La formation du personnel aux différentes procédures nécessitera l'emploi d'un maximum de 100 rats sur l'ensemble de la durée de cette autorisation, afin de couvrir aussi les formations de personnels ultérieures.

L'étude pilote nécessitera l'emploi de 40 animaux, 10 animaux par sexe seront nourris avec nourriture standard. Ils seront comparés à un nombre similaire d'animaux nourris avec une diète enrichie en graisse et en sucre, représentative d'un régime hypercalorique pouvant mener à l'obésité.

La comparaison des groupes d'animaux permettra d'accumuler des données et de mettre en évidence les variations observées dans le cadre d'une exposition à ce type de régime.

Pour déterminer le fonctionnement des mécanismes régulateurs du métabolisme, nous prévoyons d'analyser régulièrement le sang, par le biais de prises de sang. Nous effectuerons aussi des tests de tolérance au glucose, administré par gavage. Nous effectuerons enfin des analyses de sensibilité à l'insuline, injectée par voie intrapéritonéale.

L'ensemble de ce projet utilisera des animaux mâles et femelles provenant d'une animalerie agréée, hormis pour la formation du personnel qui pourra être faite sur des animaux disponibles dans notre animalerie.

Au total, ce projet pour au maximum nécessitera l'emploi de 140 Rats.

Concernant la réduction, nous avons comme but d'employer le moins d'animaux possibles tout en restant dans les normes éthiques. Pour cela, nous déployons une batterie de tests sur les mêmes animaux, en respectant un écart de deux semaines entre chaque procédure.

Par ailleurs, nous utiliserons 10 animaux par groupe ; cet effectif correspond aux groupes expérimentaux habituellement utilisés dans ce type de tests chez le Rat. Les données que nous allons obtenir dans le protocole pilote nous permettront de définir la puissance statistique à laquelle nous pouvons prétendre. Tous les tests utilisés font partie des tests de phénotypage classiquement utilisés dans la recherche préclinique et décrits dans la littérature.

En terme de raffinement, nous tenterons autant que c'est possible de garder les animaux groupés, et de les manipuler fréquemment. Les Rats sont des animaux nécessitant une manipulation fréquente, et des relations sociales. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux, ainsi qu'une pesée hebdomadaire. Les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance. Par ailleurs, les animaux bénéficieront d'un enrichissement de leur milieu. Durant les procédures expérimentales, tous les efforts seront entrepris pour minimiser le stress encouru, pour limiter la douleur et la contrainte qu'elles imposeront aux animaux avec un recours à une analgésie pour le prélèvement de sang, un suivi de glycémie lors d'un test métabolique ainsi qu'à des temps de récupération entre chaque procédure permettant d'éviter un effet cumulatif.

En terme de remplacement, ce type de protocole nécessite l'emploi de modèles animaux, car il n'existe à l'heure actuelle aucune alternative, que ce soit en terme de modélisation *in silico* ou d'expérience *in vitro*. Nous cherchons en effet à étudier un système de régulation complexe, faisant intervenir plusieurs organes et voies de contrôle au sein d'un organisme complexe.

11919 Bien que la latéralisation cérébrale ait longtemps été considérée comme une caractéristique propre à l'espèce humaine, il est aujourd'hui reconnu que ce phénomène est largement répandu au sein du règne animal. Si le rôle de différents systèmes de neurotransmission dans ces asymétries a été mis en évidence chez les vertébrés, aucune donnée n'existe encore chez les invertébrés. Or, mieux comprendre les corrélats neurobiologiques des asymétries cérébrales chez les invertébrés pourrait permettre de répondre à terme à la question de savoir si la latéralisation cérébrale chez les vertébrés et les invertébrés est le résultat d'une homologie (ancêtre commun) ou d'une homoplasie (convergence au cours de l'évolution).

La seiche *Sepia officinalis* est devenue récemment un modèle de choix pour des études sur le développement de la latéralité visuelle chez les invertébrés. Ainsi, les objectifs de ce projet sont : 1) d'étudier le développement post-embryonnaire de la latéralité visuelle (i.e. utilisation

préférentielle d'un œil) chez la seiche, 2) d'étudier l'implication du système sérotoninergique dans cette asymétrie comportementale par deux approches : (a) l'administration d'antagonistes à un récepteur à la sérotonine chez la seiche, (b) l'étude de la répartition des récepteurs à la sérotonine dans les deux moitiés du système nerveux central. Cette étude portant sur le comportement et le cerveau, elle nécessite de travailler sur l'animal vivant. Toutefois, le test comportemental utilisé est non invasif. D'autre part, dans un souci de limitation du nombre d'individus à tester, les mêmes individus permettront d'étudier le développement de la latéralité au niveau comportemental (1) et neurobiologique (2b). Toutes les mesures seront prises pour ne pas faire souffrir les seiches qui seront anesthésiées avant d'être euthanasiées. Un maximum de 150 seiches élevées en laboratoire sera utilisé, elles seront par ailleurs élevées dans des bacs en conditions enrichies (plantes artificielles, cailloux, coquillages et abris). Les tests comportementaux décrits dans ce projet ont été validés par l'obtention d'un financement de l'Agence Nationale pour la Recherche.

11920 Chaque année 1,5 millions d'européens sont victimes d'un traumatisme crânien le plus souvent subit lors d'un accident de la route, d'une chute ou au cours de pratiques sportives. 70 000 personnes perdent la vie des suites du traumatisme et environ 100 000 ne présentent pas de récupération totale et demeurent handicapés, notamment chez les enfants et les jeunes adultes qui représentent une population particulièrement vulnérable en regard de ce type de traumatisme. Bien qu'au cours des dernières années un raffinement des procédures de prise en charge par les urgences et les hôpitaux a permis de réduire la mortalité des traumatisés crâniens, il est apparu qu'un grand nombre de patients souffrent par la suite de désordres chroniques invalidants tels que : épilepsie, dépression, démence progressive, etc. À ce jour, aucun traitement ne permet d'empêcher la mise en place de tels désordres à la suite d'un traumatisme crânien.

Dans le but d'identifier des cibles pour de potentiels traitements, un consortium européen a été mis en place afin de tester de manière multicentrique l'efficacité d'une stratégie thérapeutique sur la prévention des dommages à long terme après un traumatisme crânien. Il est composé de 6 équipes de recherche et vise à pallier au manque de reproductibilité des études pré-cliniques en mettant au point un protocole permettant d'optimiser la robustesse des résultats obtenus. En effet, le but est de tester l'efficacité de traitements potentiels sur deux modèles différents de traumatisme crânien lors d'études réparties sur trois sites différents. Il a été décidé de tester dans un premier temps l'intérêt thérapeutique d'un anticorps permettant de neutraliser les Interleukines 1 β (Interleukin 1 β neutralizing antibody).

Cette étude vise à tester l'efficacité de ce composé sur un modèle de traumatisme crânien modéré et évaluer, à l'aide de tests comportementaux et d'outils d'imagerie (IRM), si ce traitement permet de prévenir les mécanismes neurodégénératifs consécutifs au traumatisme crânien, ainsi que les atteintes cognitives et motrices associées.

Le projet respecte et applique les exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement en matière d'expérimentation animale. Les procédures expérimentales décrites dans le projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Le projet concerne 590 souris au maximum, ce nombre est réduit par l'utilisation d'un suivi longitudinal non invasif par imagerie et correspond au nombre minimum requis pour la réalisation de tests statistiques. Le fait que cet essai soit réalisé simultanément dans différentes équipes avec deux protocoles de traumatisme crânien différent garantit la fiabilité des résultats obtenus et nous permet un transfert facilité vers la clinique humaine. Finalement, le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en œuvre uniquement par du personnel technique / de recherche formé et qualifié et respecte la règle des 3R. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet et pour le garantir, les animaux sont hébergés selon les standards prévus par la réglementation : en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi (matériel de nidification, rouleau en carton et barre à ronger). Des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux. La procédure de traumatisme crânien a été validée par la vétérinaire afin de garantir un protocole d'anesthésie/analgésie optimal ainsi que des soins post opératoires adaptés.

Nous avons ainsi mis en place une surveillance accrue des animaux après induction du traumatisme afin de réagir et interrompre rapidement l'expérimentation si un animal montre des signes de souffrance.

11921 Les techniques d'imagerie IRM font partie des techniques d'observation *in vivo* non invasives et non traumatiques, utilisée en clinique. Elles autorisent un suivi longitudinal du petit animal pour évaluer et développer des stratégies thérapeutiques dans le cadre de la recherche médicale. Les imageurs IRM préclinique pour petit animal vivant offrent aussi une possibilité d'acquisition rapide, à haute résolution, quantitative et avec un contraste exceptionnel. Pour améliorer le diagnostic à des fins de recherche thérapeutique, de nouveaux agents d'imagerie biocompatibles sont développés et mis sur le marché.

Le but de ce projet : tester et valider des stratégies thérapeutiques innovantes par deux méthodes d'imagerie IRM, (i) IRM avec nouveaux agents d'imagerie et (ii) IRM multiparamétrique pour le diagnostic de tissus sains ou pathologiques.

L'utilisation de la bioimagerie IRM, permet le suivi du même animal au cours du temps conduit ainsi à une réduction du nombre d'animaux nécessaires pour effectuer un diagnostic.

Toutes les expériences seront réalisées sous anesthésie générale afin de limiter la souffrance des animaux. Le suivi *in vivo* des paramètres physiologiques du rythme respiratoire et de la température, est effectué correspondant au raffinement de la méthode d'imagerie proposée. Des antidouleurs seront utilisés en cas de nécessité notamment durant le suivi de pathologies au cours du temps. Des points-limites sont établis par les utilisateurs qui fournissent les souris, dans leurs saisines et une grille d'évaluation de la douleur est développée spécifiquement pour chaque étude. Un score de douleur trop élevé impliquera la mise à mort de l'animal avant la fin de l'étude. Le nombre d'animaux est limité au minimum pour obtenir des résultats avec des tests biostatistiques.

A terme, les résultats de ce projet permettront de développer des méthodes de diagnostic et de l'évaluation précoce de thérapies nouvelles, basées sur l'imagerie IRM, à des fins de translation chez l'Homme.

Ce projet utilisera 600 souris par an, soit 1800 souris sur 3 ans.

11922 La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par des troubles cognitifs et psycho-comportementaux entraînant une perte d'autonomie. Avec le vieillissement de la population, cette maladie représente un véritable enjeu scientifique, humain, social et économique. Dans des études antérieures, l'équipe a identifié que le taux d'expression du gène *Nxn12* était un facteur de prédisposition à la maladie d'Alzheimer. Dans l'équipe, nous avons créé un modèle murin mimant les caractéristiques (symptômes) de MA humaine (une souris déficiente pour le gène *Nxn12*). Cependant, il a également été montré que les souris dépourvues du gène *Nxn12* ne développaient pas un des marqueurs classiques de la MA, neurofibrillary tangles (NFT). Le but de ce projet, est de compléter le phénotype « Alzheimer » de notre modèle murin et donc de le rendre plus proche de celui de l'Homme. L'utilisation de la souris est donc indispensable car il s'agit dans le cas présent, d'améliorer un modèle murin. Pour cela, nous induirons l'apparition des NFT en ajoutant du zinc dans l'eau de boisson de nos animaux. Les animaux seront ensuite euthanasiés et les cerveaux seront récupérés pour les analyses biochimiques.

Au total, 40 animaux seront nécessaires à ce projet en incluant les témoins.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Ils recevront une anesthésie générale si nécessaire. Les conditions d'hébergement seront adaptées au modèle animal.

Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

11923 Les parasites *Leishmania* sont transmis à l'hôte mammifère par la piqûre d'un insecte vecteur et sont responsables de maladies parasitaires cutanées, muco-cutanées ou viscérales, cette pathologie dépendant de l'espèce en cause. Ainsi les *Leishmania* (*L.*) *major* et *L.amazonensis* sont responsables de formes cutanées tandis que l'espèce *L. donovani* provoque une pathologie viscérale, mortelle en absence de traitement. Il n'existe à ce jour aucun vaccin et outre leur toxicité, les médicaments disponibles sont de moins en moins efficaces en raison notamment de l'apparition de parasites résistants vis-à-vis de ces traitements. Le développement de nouvelles thérapies préventives ou curatives dépend de la compréhension de la biologie de ces parasites complexes.

Les *Leishmania* se développent dans l'insecte sous une forme longue et flagellée appelée « promastigote ». Lorsque ces derniers sont transmis par piqûre aux hôtes mammifères ils sont capturés par des cellules du système immunitaire au sein desquelles ils se transforment en « amastigotes » caractérisés par une forme ronde dépourvue de flagelle. La multiplication des amastigotes à l'intérieur des cellules provoque à terme la maladie. Celle-ci est limitée à des lésions cutanées pour les espèces *L.major* et *L.amazonensis* alors qu'elle se manifestera par une augmentation de la taille de la rate et du foie, organes cibles, où l'espèce *L.donovani* va se multiplier.

A ce jour la forme promastigote peut être propagée en culture, néanmoins des études en laboratoire ont montré que les parasites ainsi maintenus perdent au fil du temps certaines de leurs caractéristiques dont leur virulence. La transformation du stade promastigote à celui d'amastigote repose sur un mécanisme très complexe qu'il est difficile voire encore impossible de mimer en culture notamment pour les espèces *L.major* et *L.amazonensis*. La seule espèce pour laquelle il est possible d'obtenir en condition axénique des amastigotes est *L.donovani*. Cependant des études récentes ont montré que celles-ci ont également, entre autres, une virulence atténuée. Dans ce contexte, l'étude des mécanismes biologiques des *Leishmania* et la recherche de nouvelles molécules anti-parasitaires reposent sur l'accès à des parasites *ex-vivo* et donc à des modèles expérimentaux adaptés permettant la production en nombre de ces parasites.

En laboratoire, les rongeurs sont des hôtes permissifs au développement parasitaire qui diffèrent selon l'espèce de *Leishmania*. Ainsi, l'étude des leishmanioses cutanées peut être réalisée sur des souris alors que l'étude de la leishmaniose viscérale repose sur l'utilisation du hamster doré.

Afin de minimiser le nombre d'animaux et ainsi d'utiliser le mieux possible chaque animal, plusieurs expériences sont programmées avec les parasites purifiés à partir d'un individu. En ayant recours à un nombre limité de rongeurs femelles de laboratoire – 300 souris et 390 hamsters dorés, sur une période de 5 ans, deux objectifs essentiels de ce projet pourront être atteints : (1) étude des mécanismes associés à la virulence de ces trois espèces, au sein du genre *Leishmania* et (2) recherche de nouvelles molécules anti-parasitaires.

L'inoculation des parasites sera réalisée sur les animaux préalablement anesthésiés. L'inoculation en sous cutanée de *L. major* ou *L. amazonensis* conduit à la formation, au site d'injection, d'une lésion source de parasites virulents en grand nombre.

Ce projet comporte 2 procédures de classe de sévérité modérée. Le suivi individuel et régulier de la mesure du poids associé à l'observation des animaux permettra d'apprécier l'évolution de la maladie dont un des symptômes est la perte de poids. Des points limites ont été définis et le suivi individuel et régulier des animaux par mesure de la lésion (souris) ou du poids (hamsters) sera réalisé pour réduire toute souffrance animale et mettre à mort les animaux au plus tard lorsque le point limite est atteint. Les souris et hamsters seront hébergées en groupes sociaux compatibles, en présence d'enrichissement d'environnement à base de coton ou de sphères de plastique.

11924 Le but de ce projet est de montrer la preuve de principe de l'utilisation de liposomes comme agents de contraste bimodal pour l'imagerie IRM et optique proche infrarouge dans le cadre du diagnostic et de la thérapie de tumeurs mammaires.

Les liposomes sont couramment utilisés pour transporter des médicaments, aujourd'hui, le suivi par des techniques d'imagerie de la libération du médicament reste un défi majeur. Notre objectif est de créer de nouvelles particules (liposomes, lipoprotéines, ou toutes autres nanoparticules) à visées thérapeutiques qui permettent la visualisation de la libération du principe actif (médicament) par

voie optique. L'objectif de cette étude est d'obtenir une preuve de faisabilité de détection optique de ces nanoparticules *in vivo*. Cette étude sera faite sur des tumeurs mammaires de type 4T1 injectées de façon orthotopique dans la glande mammaire.

Ce projet sera mené conformément à la règle des 3R : l'ensemble des procédures seront réalisées sur animaux anesthésiés (raffiner). Le nombre d'animaux sera réduit (réduire). Le développement de modèles animaux reste nécessaire car il n'existe pas aujourd'hui de modèles représentatifs de la complexité d'un organisme entier sain ou pathologique (remplacer).

Durant les 18 mois du projet, nous estimons utiliser un nombre total d'animaux de : 50 souris Balb/c. Ce projet s'inscrit dans la thématique de recherche d'agents combinant des propriétés d'imagerie et thérapeutiques.

11925 Le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) est un problème de santé publique majeur associé à des pathologies graves tel que le sepsis, les chocs (hémorragiques, septiques, cardiogéniques, etc.), brûlures et les traumatismes. Le SIRS est extrêmement fréquent et peut aboutir à des conséquences dramatiques avec des défaillances multi viscérales responsable d'une mortalité élevée, d'une prise en charge lourde et de coup de santé publique important. Parmi les traumatismes générant un SIRS les systèmes de circulation extracorporelle (CEC) font partie des plus fréquents et maîtrisables car sont de plus en plus utilisés en chirurgies cardiaques. La CEC permet, en dérivant le sang et en le retransmettant par une pompe, de remplacer la fonction de 1 ou plusieurs organes et de filtrer le sang. Elles sont donc indispensables lors d'interventions ou au lit du patient mais génèrent un SIRS important (dans 100% des CEC) à grave. Les réponses intégrées à ce syndrome sont actuellement difficilement maîtrisables et aboutissent dans 40% des cas à des conséquences néfastes tel que la dysfonction multi-viscérale. Pour répondre au besoin urgent de stratégies thérapeutiques une société a mis au point des traitements visant les réponses au stress tels qu'on peut les retrouver lors d'un SIRS associés à une CEC. L'avancée de leurs travaux et du développement des molécules nécessite, avant l'arrivée en clinique, le test sur les modèles animaux représentatifs de la réalité, de la CEC. Notre projet vise à évaluer grâce à un modèle de bypass cardiopulmonaire le potentiel thérapeutique des molécules proposées sur la réponse au stress. Le but de ces études est donc de valider l'utilisation de cette stratégie comme pouvant aller vers la clinique. Dans cette étude l'établissement d'un modèle de SIRS par la mise en place d'une CEC chez le rat sera utilisée. Ce modèle sans réveil est d'ores et déjà validé, autant sur le plan expérimental, éthique et sur sa pertinence clinique et a été créé afin de faciliter le réveil de nos animaux. La dernière étape des tests de traitements sera de regarder leurs impacts sur un temps plus long, nécessitant le réveil des animaux et leurs suivis post opératoire. Pour cela une étape de mise au point du réveil des animaux est indispensable afin de raffiner nos points limites et améliorer la prise en charge de notre modèle. Cette étape nécessitera 30 rats au maximum. Enfin le test des molécules et de leurs efficacités nécessitera 20 animaux maximum selon les procédures. Ce modèle n'est ici pas remplaçable au vu de la complexité des réponses et de leurs intégrations ainsi que de l'interactions avec et entre les différents organes. Les expérimentations sont prévues pour Réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en ayant des données statistiques assez puissantes qui ne nécessiteront pas l'utilisation de nouveaux animaux, notamment grâce à l'étape de mise au point. Afin d'optimiser au maximum notre étude, nous apporterons un soin particulier à Raffiner nos techniques lors de la mise au point afin de limiter le nombre d'animaux par une meilleure reproductibilité et diminuer la mortalité dans la suite des études. Afin de prévenir les souffrances et de ne pas altérer les résultats de l'étude, une médication adaptée sera administrée et des points limites seront définis, au-delà desquels les animaux seront retirés de l'étude (signes de souffrances importants par exemple). Plusieurs investigations seront réalisées sur les mêmes animaux, afin de limiter la multiplication de groupes expérimentaux. Les groupes seront alors constitués du nombre nécessaire d'animaux, déterminés lors de la mise au point du modèle afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, le but étant de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés mais de garder une puissance statistique suffisante pour pouvoir conclure sur nos résultats. Au total, le projet devrait intégrer 300 rats Wistar.

11926 Chez les mammifères, espèce humaine comprise, la vie reproductive de la femelle se caractérise par de nombreux bouleversements physiologiques survenant lors de l'accouplement, la gestation, la mise-bas et l'allaitement. Ceux-ci s'accompagnent de modifications au niveau du système nerveux central, appelée plasticité cérébrale, indispensable à la mise en place de comportements sexuel ou maternel adaptés. Jusqu'à présent cette plasticité cérébrale n'a été étudiée que dans certaines régions du cerveau n'offrant ainsi qu'une vue parcellaire. Afin d'accéder à une analyse plus intégrative et dynamique nous voulons, explorer par une approche non invasive d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et spectroscopie par résonance magnétique (SRM), cette plasticité cérébrale survenant au cours de la vie reproductive chez la souris.

L'IRM est une technique qui est maintenant reconnue et largement utilisée en routine clinique. Cette méthode qui utilise des champs magnétiques et qui n'utilise ni rayons X ni rayonnement ionisants. Elle est non invasive et atraumatique. Elle est donc particulièrement adaptée aux études longitudinales. Contrairement à l'IRM qui fournit des images, la SRM qui repose sur le même principe fournit des spectres de la région sélectionnée (ici le cerveau). Ces spectres sont constitués de « pics » qui correspondent aux différents métabolites présents à cet endroit.

Ce projet vise à mettre en évidence des modifications structurales et fonctionnelles de régions du système nerveux central impliquées dans les étapes physiologiques associées aux comportements sexuel et maternel. L'analyse de la mise en place des changements neurobiologiques survenant lors d'une première expérience reproductive contribuera à mieux comprendre les problèmes comportementaux observés chez l'homme après une naissance (ex : rejet)

Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal souris est fondamental dans notre cas, puisque l'étude préclinique en particulier ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés scrupuleusement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles.

L'intérêt de l'IRM réside aussi dans le fait qu'une même souris peut être observée longitudinalement Dans notre étude 40 souris seront utilisées.

11927 Depuis quelques années, les recherches sur le bien-être animal, son évaluation et l'amélioration des conditions de vie des animaux ont conduit à rechercher des marqueurs de l'état émotionnel des animaux, marqueurs fiables et faciles à identifier. Les vocalisations, ou émissions sonores des animaux, sont des marqueurs de l'état interne des animaux qui reçoivent de plus en plus d'attention quant à leur intérêt pour l'évaluation du bien-être animal. Les vocalisations sont faciles à apprécier et les humains sont capables d'identifier un état émotionnel positif ou négatif chez de nombreux animaux. Ceci est vrai chez les porcs qui produisent de nombreux sons de qualités différentes qui reflètent leur état interne. Nous cherchons donc, au niveau Européen, à déterminer le lien entre la structure des vocalisations et les émotions des porcs. L'idée est de mettre au point un système de reconnaissance automatique de l'état émotionnel des porcs sur la base des vocalisations. Ce système permettra aux éleveurs d'être en permanence au fait de l'activité vocale de leurs animaux et de recevoir des alertes lors de situations potentiellement à risque pour les animaux (bagarres par exemple). Il permettra aussi scientifiquement de mieux comprendre comment les porcs perçoivent les situations qu'ils vivent ou auxquelles ils sont soumis par l'humain et comment ils expriment leurs états émotionnels.

Pour cela, nous avons besoin d'observer nos animaux lors d'interactions avec les humains. Nous utiliserons l'anticipation d'une présence humaine positive ou neutre par les porcelets, l'anticipation positive étant connue pour être source d'émotions positives. Nous allons observer au total 96 porcelets femelles (réparties en 4 lots) sélectionnées dans un panel de 120 animaux au départ (également répartis dans les 4 lots). La sélection se fera sur la base de l'état de santé, l'état émotionnel (animaux trop stressés exclus) et les capacités d'apprentissage des animaux, au fur et à mesure de l'expérience. Les animaux écartés de l'expérimentation à chaque étape resteront dans

leur loge d'élevage pour la suite et continueront le parcours classique de l'élevage. Cette marge est nécessaire d'après les études précédentes réalisées sur les porcs.

Parmi les 120 animaux, 60 seront apprivoisés par des interactions positives (groupe H+) avec un expérimentateur (caresses, paroles douces, grattages répétés pendant 2 semaines) déjà démontrées comme facilitant la relation homme-animal. 60 autres seront élevés dans des conditions normales, avec des contacts humains liés à l'alimentation, au nettoyage et aux soins aux animaux (H). Nous mesurerons le comportement des animaux lors d'un isolement de 5 minutes ainsi qu'en présence d'un humain pour évaluer la relation créée. Nous enregistrerons aussi leur rythme cardiaque, qui est une mesure du stress des animaux. Nous observerons aussi si les animaux sont dans un état positif avant de rencontrer l'humain (contentement), si ils sont capables de prévoir cette rencontre car un signal est diffusé juste avant.

Nous porterons particulièrement attention au respect des 3R dans ce projet. La notion de remplacement a été réfléchié mais il n'est pas possible à ce jour de modéliser la relation à l'homme, c'est pour cela que nous travaillerons avec des animaux. Le nombre de traitements et d'animaux a été choisi afin d'être sûr d'attendre un nombre de 24 animaux par lot pour la quatrième procédure, nous permettant de tirer des conclusions en s'affranchissant de la variabilité individuelle. Enfin, le raffinement sera assuré aussi bien pendant l'élevage (présence d'objets à manipuler, suivi régulier de la consommation d'aliment et du comportement) que lors des tests comportementaux qui peuvent induire un stress passager du fait de l'isolement social. Tout au long du projet, les animaux seront suivis quotidiennement au moment des repas par les personnes en charge de l'expérience ou les animaliers formés pour l'expérimentation animale. Tout animal souffrant sera soigné en fonction de son état, selon les recommandations vétérinaires.

11928 La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie humaine neurodégénérative qui, à l'heure actuelle, reste incurable. Elle entraîne des troubles de l'apprentissage et de la mémoire, mais affecte également d'autres fonctions telles que le langage, la reconnaissance des éléments de l'environnement et les fonctions motrices.

Au niveau du tissu cérébral des patients, cette maladie est caractérisée par une sévère atrophie du cortex cérébral, d'importants signes de stress oxydatif, et par la présence de deux marqueurs capitaux : les agrégats de peptides bêta-amyloïde (A-bêta) et les dégénérescences neurofibrillaires. Le peptide dénommé A-bêta est à l'origine de la formation des plaques séniles. Ce peptide est produit sous forme de monomères (1 molécule d'A-bêta) qui s'associent en oligomères (au-delà de 3 molécules d'A-bêta) très toxiques pour les neurones et les synapses. L'interaction avec les membranes synaptiques initie la cascade de perturbations cellulaires conduisant aux dysfonctionnements synaptiques puis à la dégénérescence des neurones, en particulier dans l'hippocampe, une structure cérébrale fortement impliquée dans la mémorisation. Le peptide A-bêta, sous forme oligomérique est donc un acteur majeur, au moins lors des stades précoces, de la MA.

Actuellement, seuls des traitements à visée symptomatique sont disponibles ; ils ne traitent pas la maladie mais masquent certains déficits comportementaux. La modulation de la pathologie amyloïde représente une cible thérapeutique clé pour retarder la MA. En plus des stratégies visant à diminuer les niveaux d'A-bêta, la réussite du traitement de la MA nécessitera probablement l'application concomitante d'agents neuroprotecteurs pour enrayer la détérioration synaptique et cognitive en cours. Il est clairement établi que les oligomères d'A-bêta perturbent la fonction synaptique menant à l'altération des performances cognitives. La protection contre la synaptotoxicité des oligomères d'A-bêta est nécessaire pour empêcher la neurodégénérescence associée à l'Alzheimer.

C'est pourquoi la mise en place d'un modèle de MA induit par l'injection intracérébroventriculaire (icv) d'oligomères solubles d'A-bêta (ABO) représente un bon outil pour le screening de produits à visée thérapeutique dans la MA. En effet, ce modèle se caractérise par des altérations synaptiques associées à des troubles mnésiques et cible l'hippocampe, structure directement impliquée dans les fonctions cognitives et les troubles mnésiques observés dans l'Alzheimer.

Notre projet a pour objectif d'évaluer l'efficacité de 60 produits sur les altérations comportementales et tissulaires induite par l'administration icv d'ABO chez la souris (procédure 1). L'administration des produits testés sera effectuée soit par voie intranasale, soit par voie intrapéritonéale, soit par voie orale (procédure 2), selon le type de produit et de cibles thérapeutiques. Pour évaluer les effets mnésiques des produits, après l'administration icv d'ABO, les animaux réaliseront des tests mesurant leurs performances de mémoire grâce à différents paradigmes comportementaux : le test du labyrinthe en Y (mémoire spatiale à moyen terme) (procédure 3), le test de reconnaissance d'objet (mémoire à court et moyen terme) (procédure 4), le test de déplacement d'objet (procédure 5), le test de coordination sensorimotrice (procédure 6) et le test de la piscine de Morris (mémoire spatiale à long terme) (procédure 7).

Au maximum 1440 souris mâles C57BL6J âgées de 11 semaines à leur arrivée seront utilisées dans ce projet, sur 5 ans.

Les animaux seront hébergés à 3 par cage, en cycle de lumière inversé, pour observer leur comportement à la suite des traitements effectués pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et avec un enrichissement de la cage. Un soin particulier sera apporté à la prise en charge de la douleur : au cours de l'opération chirurgicale par une anesthésie générale à l'aide d'un gaz anesthésique (Isoflurane) et en post opératoire par l'administration d'un anti-douleur morphinique (buprénorphine) (Raffinement).

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation et en cas d'atteinte d'un des points limites fixés (perte de poids, agressivité, cachexie, vocalises, infection post-opératoire), ils seront mis à mort dans des conditions éthiques.

Dans notre projet, nous avons veillé à pouvoir réduire au maximum les animaux tout en gardant une bonne sensibilité statistique si cela était possible (réduction). Nous veillerons à la réduction de facteurs environnementaux induisant des variabilités dans les résultats pour assurer une très bonne reproductibilité des expériences (réduction du stress, prise en charge de la douleur post-opératoire) (Raffinement). La modélisation de la MA à ce niveau complexe d'intégration ne peut à l'heure actuelle être modélisé *in vitro* ou *in silico* (Remplacement).

11929 Un partenaire académique a fait générer au sein de notre institut une lignée de Souris génétiquement modifiée pour un récepteur NMDA. Cette modification vise à déterminer de manière très spécifique le mode d'action de ces canaux qui jouent notamment un rôle dans le stockage de l'information.

Ces récepteurs ont toujours présenté un intérêt particulier car leur activation normale est essentielle pour les processus cognitifs tels que l'apprentissage et la mémoire alors que les troubles de la fonction NMDA sont impliqués dans un large éventail de pathologies psychiatriques, de la schizophrénie à l'arriération mentale et à l'épilepsie.

Cette lignée d'animaux nouvellement crée doit maintenant être caractérisée, aussi bien en terme de mémorisation/apprentissage, que dans d'autres composantes du système nerveux central. Il est en effet possible que cette modification génétique puisse altérer d'autres fonctions physiologiques.

Nous étudierons donc : l'activité circadienne, la force musculaire, les capacités de coordination motrice, la mémorisation, la reconnaissance sociale et la susceptibilité aux troubles épileptiques par le biais d'une série de tests employant 48 animaux, à raison de 12 animaux par génotype (contrôle ou mutant) et de deux cohortes expérimentales pour réaliser l'ensemble des tests.

Réduction : Cet effectif de 12 animaux par groupe nous permet d'obtenir une puissance d'analyse statistique satisfaisante tout en réduisant autant que possible le nombre de souris employées. Nous soumettons ces animaux à une série de tests, en minimisant les interactions possibles entre tests. Cet ensemble de données générées sur les mêmes animaux permettra par recoupement de caractériser de manière assez exhaustive le modèle murin et les altérations qu'il présente du fait de la mutation génétique.

Remplacement : le but de ce projet est de déterminer le rôle joué par une population précise de récepteurs NMDA. Cette étude n'est actuellement pas possible dans un modèle *in vitro* ou *in silico* car elle nécessite un organisme complet

Raffinement : Cette lignée de souris ne présente aucun trouble visible dans les conditions d'hébergement classique. Nous n'attendons pas de mortalité liée à la mutation génétique. Néanmoins, une surveillance quotidienne est mise en place. L'accès à l'eau et à la nourriture sont assurés en permanence. Si l'état de santé des animaux semble dégradé, notamment en présence d'un mauvais toilettage ou d'une prostration/inactivité, une surveillance du poids sera mise en place ainsi que des soins si nécessaires après consultation vétérinaire.

11930 L'expérimentation animale, utilisée en recherche et en formation, s'effectue dans un cadre réglementaire national (décret et arrêtés d'application du 1^{er} février 2013). Toute personne utilisant des animaux dans des procédures expérimentales doit faire reconnaître ses qualifications professionnelles nécessaires à l'exercice de ses fonctions au travers d'une formation diplômante.

Dans ce contexte, l'Université de Rouen-Normandie souhaite mettre en place une formation diplômante de niveau « Appicateur de procédures expérimentales » chez les rongeurs et les lagomorphes, destinée au personnel scientifique participant directement à des expériences sur des animaux vivants sous la direction d'un responsable titulaire de l'autorisation à expérimenter sur animaux de niveau « concepteur de projets ».

Cette formation inclue dans son programme des heures de travaux pratiques (TP) utilisant des animaux, nécessaires à l'acquisition et l'évaluation des bonnes pratiques de l'expérimentation animale et dans le respect du bien-être animal. Ces travaux porteront sur la préhension, la contention ainsi que sur les différentes voies d'administration et de prélèvement chez la souris et le rat.

La formation est ouverte pour une capacité maximale de 54 personnes réparties en 3 groupes de 18 pour les travaux pratiques. Chaque groupe sera composé de 9 binômes qui disposeront chacun de 2 souris et 2 rats. Les intervenants assureront une partie démonstration avant de laisser les stagiaires apprendre les bons gestes. Pour cela 2 souris et 2 rats seront nécessaires pour chaque session de TP. Les rats ne seront inclus dans les travaux pratiques que pour la partie préhension - contention. Ils seront ainsi réutilisés d'un groupe à l'autre. L'effectif total nécessaire au bon déroulement des séances sera donc de 60 souris (3 sessions x 9 binômes x 2 souris par binôme + 2 souris x 3 sessions pour les intervenants) et 20 rats (9 binômes x 2 rats + 2 rats pour les intervenants) sans préférence de sexe. A raison d'une session par an sur 5 ans (durée de la saisine), le nombre d'animaux total sera de 300 souris et 100 rats soit 400 animaux.

L'utilisation des animaux vivants est indispensable à ce type de formation visant à transmettre aux stagiaires les bonnes pratiques, les bons gestes et les bonnes attitudes à avoir vis-à-vis des animaux dans le cadre de procédures expérimentales. Le remplacement des animaux paraît donc difficile à envisager dans ce type de formation. Toutefois, un effectif minimal a été envisagé. Les rats seront de plus, réutilisés d'une part à chaque TP et d'autre part à l'issue de ces derniers dans les TP de physiologie animale de Licence eux mêmes déclarés dans une autorisation de projet. Ces travaux pratiques ne mettront en œuvre que des procédures légères n'impliquant rien de plus que la piqûre d'une aiguille et ont été conçus de manière à minimiser la souffrance et la détresse des animaux. Pour autant, si des signes cliniques de stress ou de souffrance marqués venaient à se manifester, des mesures seraient prises pour y remédier.

11931 Les maladies autoimmunes (MAI) représentent aujourd'hui la troisième cause de mortalité dans les pays développés après les affections cardiovasculaires et le cancer. Il existe plus de 80 MAI parmi lesquelles les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), Maladie de Crohn (MC) et Rectocolite hémorragique (RCH) qui des besoins médicaux non satisfaits. En effet, la prise en charge des MICI fait appel à des traitements présentant des effets indésirables, un fort taux de non-réponses et des taux d'échappements thérapeutiques importants. Ces deux types de pathologies (RCH et MC) sont dus entre autres à un dysfonctionnement du système immunitaire, en particulier contre la flore intestinale, et notamment à une mauvaise régulation des lymphocytes T (LT). Nous

avons montré le potentiel pro-apoptotique de l'anticorps anti-CD45RC sur les LT effecteurs en transplantation ce que favorise la tolérance allogénique à travers de la potentialisation des LT régulateurs spécifiques du donneur. Le traitement anti-CD45RC était capable d'inhiber ne pas seulement le rejet aigu et chronique des organes solides chez les rats, mais aussi la maladie du greffon-versus-l'hôte (GVHD) chez les rats et la souris NSG humanisée. L'anticorps anti-CD45RC ouvre donc la voie à de nouvelles biothérapies innovantes, plus sélectives, moins toxiques et à fort potentiel d'efficacité en transplantation et de la même façon en autoimmunité. L'objet de cette saisine est d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'anticorps anti-CD45RC souris dans des modèles précliniques de colites inflammatoires chez la souris C57Bl6. Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit : - Remplacer : Des études fonctionnelles ont été réalisées *in vitro* à partir de cellules de rongeur et aussi des cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études *in vivo*. C'est pourquoi nous ne pouvons pas nous affranchir de l'utilisation d'animaux dans ce projet. - Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 10 souris, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les tests statistiques utilisés seront non paramétriques (Test de Mann-Whitney) car nous ne pouvons pas assurer d'une distribution normal ($n < 30$). Nombre total de souris : 200 répartis sur les deux modèles différents de colite (100 souris par modèle avec 5 groupes de 10 souris en état aigue et 5 groupes de 10 souris en état chronique). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. -Raffiner : Toutes les interventions "invasives" (injections de produits chimiques) sur l'animal seront réalisées sous anesthésie générale. Les animaux seront suivis quotidiennement lorsque le modèle de colite sera induit et les signes cliniques notables et sévères seront notés. Lorsque deux signes cliniques notables seront présents alors il sera administré deux fois par jours une dose de morphinique (buprénorphine 0.05mg/Kg en sous cutané), puis lorsque 3 signes cliniques notables ou 1 seule signe sévère seront notés alors les animaux seront sortis du protocole et euthanasiés. Un tableau sur le signes notables et sévères a été ajouté en annexe. Tous les animaux seront analysés post-mortem avec des prélèvements d'organes en vue des études d'immunohistochimie permettant de caractériser au mieux le bénéfice du traitement avec l'anticorps anti-CD45RC. Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique de l'anticorps anti-CD45RC souris sur les réponses immunes intervenant dans des contextes de maladies autoimmunes au niveau de l'intestin et de mieux comprendre ses mécanismes d'action par les analyses des souris traitées. L'utilisation d'un anticorps antiCD45RC fait l'objet d'un brevet quant à son potentiel thérapeutique prometteur dans le domaine de la transplantation d'organe solide et de la GVHD mais aussi pour le traitement de maladies autoimmunes.

11932 Les patchs de couleur chez les animaux forment une catégorie majeure de signaux de communication qui reflètent fréquemment des traits de qualité individuels corrélés avec des facteurs génétiques et/ou avec la condition phénotypique. D'après la théorie en biologie évolutive, la fiabilité de l'information d'un signal de couleur peut être maintenue si un coût significatif est associé à sa production et/ou sa maintenance, par exemple, expliqué par son lien avec la sécrétion d'hormones. En effets, certaines hormones telles que la testostérone sont bien connues pour leur rôle dans le maintien de caractères sexuels secondaires comme la coloration mais leur biosynthèse peut aussi avoir des effets néfastes sur l'organisme, comme une immuno-suppression ou une accélération de la sénescence.

L'objectif de ce projet est d'étudier la relation entre l'expression des signaux UV sur la gorge de lézards mâles du lézard vivipare (*Zootoca vivipara*) et la sécrétion de testostérone (T) au stade adulte. Dans cette optique, nous procéderons à une expérience dans laquelle nous augmenterons ($n=20$) et bloquerons ($n=20$) de manière non invasive le taux de T plasmatique de mâles adultes du lézard vivipare par rapport à un lot témoin ($n = 20$). Pendant 15 journées consécutives dès sortie d'hibernation des lézards, nous appliquerons quotidiennement une solution huileuse de testostérone (T+), d'inhibiteur (T-) ou d'huile (témoins) sur le dos des lézards (méthode non-invasive). Immédiatement avant et après cette manipulation, nous effectuerons des mesures de morphologie, de couleur et de performance (force de morsure) afin de détecter d'éventuelles

variations à court terme dûes à l'augmentation de testostérone. Les lézards seront ensuite relâchés dans des enclos semi-naturels où ils participeront à la reproduction. Ils seront recapturés en juin 2019 pour effectuer une nouvelle série de mesures de coloration, morphologie et performance.

Ce projet, complémentaire d'une étude conduite sur le développement de la coloration chez les subadultes, nous apportera de précieuses informations nous permettant de mieux comprendre comment les signaux UV varient au cours d'une même saison de reproduction en relation avec la sécrétion de testostérone. Le nombre d'individus utilisés correspond au nombre minimum qui sera suffisant pour mener nos analyses statistiques. Les conditions d'élevage impliqueront un enrichissement des cages et des conditions climatiques correspondant au milieu naturel. De plus, nous avons choisi de développer la méthode la moins invasive possible pour augmenter la testostérone des lézards (i.e. application cutanée) après validation par une étude pilote conduite en 2018. Il n'est pas possible de remplacer le modèle biologique de cette étude par un équivalent cellulaire ou *in silico*.

11933 Les troubles du spectre autistique (TSA) sont des troubles psychiatriques neurodéveloppementaux caractérisés par des marqueurs comportementaux : altérations de la communication sociale ainsi que des comportements stéréotypés et des intérêts restreints. Derrière cette définition, une grande variabilité comportementale existe et chaque patient présente des symptômes plus ou moins sévères avec une ou plusieurs comorbidités.

Des mutations au sein de plusieurs gènes ont été associées à la vulnérabilité aux TSA, et en particulier au sein du gène SHANK3. Ces mutations sont responsables de troubles autistiques sévères avec déficience intellectuelle. Ce gène code une protéine importante pour l'établissement et le maintien des points de contacts entre les neurones (les synapses). Afin de comprendre les modifications de ces points de contacts et celles du comportement engendré par une mutation du gène SHANK3, plusieurs modèles de souris portant une mutation à différents emplacements du gène Shank3 ont été générés.

Dans une étude précédente, le comportement d'un de ces modèles invalidés pour Shank3 a été caractérisé. Les souris présentent des problèmes de locomotion, d'interaction sociale ainsi que des mouvements répétitifs avec une grande variabilité entre individus. Ces anomalies peuvent être rapprochées des observations cliniques chez les patients. Pour déterminer les modifications cérébrales, une analyse de l'expression de l'ensemble des gènes du cerveau a été réalisée en comparant les résultats entre souris invalidées ou non pour Shank3. Cette analyse a révélé un déséquilibre dans l'expression de gènes synaptiques d'une structure particulière du cerveau, le striatum. Le striatum est une structure fortement impliquée dans le contrôle des mouvements mais également dans la cognition, y compris la cognition sociale.

Le présent projet permettra de valider l'analyse précédente en étudiant la variabilité du comportement observée chez ces souris, mais également de tester des molécules pharmacologiques visant spécifiquement les neurones du striatum afin de réduire les problèmes comportementaux observés. Les animaux participant à cette étude seront soumis à des tests comportementaux non-invasifs (observation et annotation du comportement via un dispositif vidéo) pour tester l'anxiété, les capacités intellectuelles (test de mémoire), la locomotion, la sociabilité (interaction directe avec un congénère inconnu) et la présence de comportements stéréotypés (présence d'auto-toilettage excessif). Ces individus recevront des doses fixes de molécules pharmacologiques, utilisé chez les patients ou d'autres composés, par injection ou dans la nourriture, afin d'observer leurs effets sur le comportement et l'expression des gènes. Nous testerons des souris mâles et des souris femelles adultes, âgés de trois mois, marqué par une puce de marquage RFID. Nous constituerons des groupes de 10 individus par génotype, par sexe et par traitement. Le traitement de la procédure 1 sera une seule injection intra-péritonéale réalisée avant les tests comportementaux et le traitement de la procédure 2 sera dans la nourriture. Sur la totalité du projet, nous prévoyons d'utiliser 288 souris sur 5 ans sur deux procédures. Le nombre d'animaux qui seront utilisés a été réduit au minimum, en ajustant au mieux les protocoles pour obtenir des résultats statistiques robustes, avec l'aide de biostatisticiens, et tout en tenant compte de la variabilité interindividuelle des animaux testés. La phase de présélection des molécules sur cellules

souches humaines a permis aussi de réduire le nombre de molécules testées et donc le nombre d'animaux utilisés. Les doses testées dans ce projet sont établies par rapport à la littérature existante, ce qui permet aussi de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Pour tester les effets des traitements, les tests comportementaux sont obligatoires (diagnostic des TSA basés sur des traits comportementaux), le remplacement de l'expérimentation animale n'est donc pas possible. Les expériences comportementales réalisées dans les procédures 1 (240 individus) et 2 (48 individus) ne sont pas considérées comme invasives et n'engendrent qu'un stress limité et très ponctuel. Afin de réduire la douleur lors de la mise en place des puces de marquage, les animaux seront sous anesthésie gazeuse et recevront une injection sous cutanée d'analgésique léger (lidocaïne). Même si ces procédures sont considérées comme légères, une mise en place de points limite et une surveillance étroite des animaux sera assurée pour détecter au plus tôt des signes cliniques anormaux et intervenir pour limiter tout stress, inconfort ou douleur.

Ce projet permettra de mieux comprendre l'impact des mutations SHANK3 sur le cerveau et d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques pour les patients atteints de TSA.

11934 La plasticité structurale est définie comme la capacité des cellules du cerveau à modifier leur morphologie et les circuits qu'elles établissent en réponse à un stimulus. Cette propriété du cerveau est relativement bien caractérisée pendant le développement embryonnaire, mais très peu étudiée dans le cerveau adulte où elle était même considérée comme inexistante il y a encore quelques dizaines d'années. Cependant, de plus en plus d'études chez l'homme montrent que la forme même du cerveau est différente chez les patients souffrant de maladies neuropsychiatriques (comme la schizophrénie et l'addiction). La plasticité structurale du système nerveux central pourrait ainsi représenter un mécanisme important à l'origine de nombreuses maladies neurologiques chroniques. Certaines substances chimiques comme le principe actif du cannabis peuvent agir directement sur la forme des neurones et réduire rapidement la taille de leurs prolongements. Cet effet "anti-pousse" est provoqué par l'activation d'une protéine particulière, la myosine non-musculaire de type II, véritable moteur moléculaire au sein des cellules permettant la contraction de leur cytosquelette à l'instar des muscles. Cette contractilité neuronale rendue possible par la myosine pourrait ainsi être impliquée dans la genèse de troubles psychotiques et pourrait donc représenter une cible thérapeutique intéressante. Les troubles de la mémoire et d'apprentissage sont fréquents chez les patients atteints de maladies neuropsychiatriques et aussi observés lors de la consommation de cannabis et sont liés à une altération de la morphologie et connectivité du cerveau. Ainsi, le but de ce projet est d'étudier le rôle de la myosine non-musculaire sur la plasticité neuronale chez le rat en utilisant la mémoire et les fonctions cognitives comme indicateurs. Pour cela, nous utiliserons 4 tests de comportement : reconnaissance d'objets, « prepulse inhibition », réponse à la nouveauté sociale et les fonctions motrices. Des données récentes observées *in vitro* suggèrent en effet que les cellules du cerveau peuvent subir des variations morphologiques grâce au remodelage de la myosine. Le recours à l'utilisation d'animaux de laboratoire est maintenant nécessaire pour ce projet. Les petits rongeurs représentent un modèle préclinique de choix pour l'évaluation pharmacologiques de composés actifs.

Nous utiliserons deux molécules qui seront administrées par voie intrapéritonéale ou directement dans le cerveau par voie intra-cérébro-ventriculaire grâce à une canule d'injection mise à demeure via chirurgie stéréotaxique, car il ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique. Pour éviter toute souffrance, les procédures de chirurgie se feront sous anesthésie générale. Les animaux seront observés quotidiennement. Une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur, souffrance, angoisse ou stress sera soulagé avec des analgésiques. Un grand soin sera porté afin d'empêcher tout stress ou souffrance des animaux en privilégiant des procédures non-invasives et en effectuant un suivi journalier du bien-être des rongeurs grâce à une échelle dédiée. Le nombre d'animaux sera le plus faible possible tout en permettant de réaliser une analyse statistique des résultats. Ce projet nécessitera au maximum 480 rats, pour une durée de 5 ans. Des analyses intermédiaires réalisées avant la fin du projet permettront de raffiner ce nombre et de le réduire en cas d'effet significatif à mi-projet. A terme, les résultats issus de ce projet permettront de mieux comprendre le rôle de la contractilité de la myosine non musculaire au niveau

du système nerveux central. Ils pourraient permettre l'émergence d'une nouvelle classe pharmacologique pour la prévention ou le traitement de nombreuses maladies neuropsychiatriques.

11935 La rétinopathie diabétique (RD) est la cause principale de cécité affectant une population en âge de travailler. Du fait de notre mode de vie « occidental », cette pathologie évolue de manière endémique et affecte un nombre croissant de personnes.

Les premiers stades de la maladie se caractérisent par une dégénérescence microvasculaire et neuronale accompagnée de microanévrismes, d'hémorragie et d'œdème vasculaire ; ce stade est appelé RD non proliférante (RDNP). Cependant la maladie peut évoluer vers une forme proliférante au cours de laquelle l'apparition accrue de néovaisseaux au niveau de la rétine peut entraîner la cécité du patient atteint.

Il nous apparaît donc essentiel de comprendre les mécanismes des premiers stades de la maladie afin d'identifier de futures cibles thérapeutiques permettant de stopper l'évolution de la maladie.

Des études passées ont permis d'identifier des substances qui joueraient un rôle essentiel dans les mécanismes angiogéniques de la rétine (les cytokines par exemple). Nous voulons étudier dans ce projet l'influence des substances identifiées durant la phase de développement du réseau vasculaire de la rétine. Chez la souris, cette phase se situe entre la naissance et les 8 jours de l'animal.

Nous injecterons donc ces substances à des animaux âgés de 4 jours par voie intraoculaire. Les études histologiques du réseau vasculaire de la rétine seront réalisées après euthanasie de l'animal (48h après l'injection). Une dizaine de substances seront testées. Au total, 408 animaux seront nécessaires à cette étude en incluant les contrôles.

Les études préliminaires *in vitro* ont déjà été réalisées. L'utilisation de l'animal est indispensable à ce stade du projet pour comprendre l'effet de ces substances sur le réseau vasculaire de la rétine en développement dans son ensemble. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les animaux bénéficieront d'une anesthésie gazeuse pour les injections intraoculaires. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien être.

11936 La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin d'étiologie inconnue, elle serait multifactorielle. Chez des patients prédisposés génétiquement et sous l'influence de facteurs environnementaux, elle résulterait d'une interaction anormale entre le système immunitaire et le microbiote intestinale. Le microbiote intestinal des patients présente une dysbiose avec une diminution de la diversité des espèces présentes. On note une diminution de certaines espèces à potentiel anti-inflammatoire et une augmentation de bactéries aux propriétés pro-inflammatoires. En effet, des souches d'E. coli colonisent anormalement l'intestin des patients avec MC par rapport à des individus sains et seraient impliquées dans l'induction ou la chronicité de l'inflammation intestinale. *In vitro*, ces souches présentent des caractéristiques spécifiques d'adhésion aux cellules de l'épithélium intestinal, d'invasion de ces cellules et de survie au sein des macrophages.

Aucun des traitements actuels ne permet la guérison. Ils se limitent à un contrôle plus ou moins complet de l'activité inflammatoire, sans traiter la cause de la maladie, et nécessitent d'être prescrit au long cours. Ils sont associés à de nombreux effets indésirables dont certains sont potentiellement graves (cancers solides, lymphomes...). La recherche de nouvelles options thérapeutiques moins toxiques et plus efficaces est donc une priorité pour améliorer la prise en charge des patients atteints de MC et leur qualité de vie. Parmi les différentes voies possibles, l'utilisation d'une thérapeutique visant à limiter voire à éradiquer le portage des souches d'E. coli chez les patients dépistés comme porteurs constitue une option séduisante de médecine personnalisée. Pour cela, l'usage

d'antibiotiques pourrait être envisagé. Les avantages de ce type de molécules sont la bonne maîtrise de leurs effets indésirables, qui sont, pour la plupart des molécules, assez bien connus et limités, et la bonne connaissance de leur activité sur ce type d'espèce bactérienne. Les inconvénients de ce type de stratégie sont la modification du microbiote intestinal induite par l'utilisation répétée d'antibiotiques au cours de la vie du patient et le risque d'émergence de résistance chez les bactéries après plusieurs cures. Pour limiter la modification du microbiote intestinal, le choix des molécules devra se poser sur des molécules potentiellement actives sur les souches d'E. coli associées à la maladie de Crohn, mais peu ou pas actives sur les espèces bactériennes principales du microbiote, c'est-à-dire les bactéries anaérobies. L'utilisation d'une association d'au moins deux antibiotiques pourrait permettre de limiter le risque d'émergence de résistance au cours du traitement. De plus différents travaux suggèrent que les antibiotiques pourraient présenter, outre une activité antibactérienne, une activité anti-inflammatoire sur les cellules humaines. De tels effets pourraient renforcer l'intérêt d'une stratégie antibiotique dans le traitement de la MC.

Des travaux antérieurs ont montré une efficacité *in vitro* de l'association ciprofloxacine-rifaximine sur une souche d'E. coli adhérente et invasive isolée d'un patient avec maladie de Crohn. Un essai clinique est actuellement en cours, pour évaluer l'apport clinique d'une telle approche, il s'agit d'un essai randomisé, contrôlé, multicentrique, en double-aveugle évaluant l'efficacité de l'association ciprofloxacine-rifaximine pour l'éradication des E. coli adhérents et invasifs dans la maladie de Crohn iléale ou iléocolique droite de l'adulte.

L'objectif du projet est d'étudier, chez des souris colonisées par des bactéries E. coli au profil adhérent et invasif et isolées de patients atteints d'une maladie de Crohn, l'efficacité d'une antibiothérapie par rifaximine et ciprofloxacine sur l'éradication de ces bactéries et l'inflammation qui en résulte, en comparaison avec des souris infectées et non traitées, des souris non infectées et non traitées, et enfin des souris non infectées et bénéficiant de la même antibiothérapie. Les souris expriment le récepteur humain aux bactéries E. coli. Ce modèle murin permet de reproduire la colonisation de la muqueuse intestinale par les E. coli au profil adhérent et invasif observée chez les patients avec MC.

-Le nombre d'animaux dans ce projet été réduit au minimum, dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet. Le nombre de 10 animaux par lot a été déterminé pour assurer des résultats statistiquement significatifs. En considérant 4 lots, les essais nécessiteront au total 40 souris

-La durée totale du projet est de 4 mois ; elle prend en compte le temps de génération des souris transgéniques.

-Les bactéries seront administrées par voie orale à la dose de 3×10^9 bactéries en une seule fois.

-Les animaux seront ensuite traités pendant 5 jours selon le groupe auquel elles auront été assignées ; les antibiotiques seront administrés par gavage. Pendant les 5 jours suivant l'arrêt du traitement, on surveillera les symptômes de diarrhée, les taux d'antibiotiques dans les fèces, les marqueurs de l'inflammation.

-Les animaux seront mis à mort 10 jours après l'infection par anesthésie par inhalation d'isoflurane puis dislocation cervicale. Les iléons et les côlons seront collectés pour évaluation du nombre d'E. coli associées aux muqueuses intestinales et de l'inflammation (marqueurs inflammatoires, dommage de la muqueuse intestinale).

-Les animaux seront disposés dans des cages de 450 cm² (4 animaux par cages). Une période d'acclimatation sera réalisée avant le début de la procédure (une semaine). Un enrichissement est proposé aux souris : lamelles de cartons compressées et maisonnettes.

-Une inflammation intestinale légère à modérée est attendue en réponse à l'infection bactérienne des animaux. Les animaux sont donc surveillés quotidiennement pour tout signe de souffrance. Si un animal remplit 3 des critères suivants (points limites) :

1/perte de poids > à 15%,

2/immobilité, ou position recroquevillée, ou dos vouté, ou augmentation de la fréquence respiratoire/respiration pénible,

3/signes cliniques d'inflammation intestinale (pelage et orifices souillés avec diarrhée et/ou présence de sang dans les fèces),

il sera immédiatement sorti du protocole et euthanasié par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane

11937 La maladie de parkinson est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle touche 0.3% de la population et plus de 1% des plus de 60 ans, la maladie débutant habituellement entre 45 et 70 ans. En France 160 000 personnes sont traitées pour la maladie de Parkinson et plus de 20 000 nouveaux cas apparaissent chaque année. Cette maladie chronique neurodégénérative affecte le système nerveux central et entraîne progressivement des troubles moteurs : mouvements ralentis, tremblements, rigidité puis des troubles cognitifs. Ses causes sont mal connues mais les symptômes semblent être la conséquence de la perte en neurones de la substance noire (locus niger) et d'une atteinte des faisceaux nigro-striés.

La principale thérapeutique par administration de L-DOPA, un précurseur de la dopamine, freine l'évolution de la maladie et améliore les signes cliniques du patient. Toutefois la prise de ce médicament n'est pas exempt d'effets secondaires avec notamment l'apparition de dyskinésies apparaissant dans presque 50% des cas après plusieurs années de traitement. Une hypothèse récente expliquant ces effets indésirables passerait par l'activation de la microglie cérébrale, qui par son rôle immunitaire va sécréter des facteurs pro-inflammatoires endommageant le fonctionnement normal des neurones.

Il est intéressant de noter qu'une autre maladie du patient âgé est probablement aussi dépendante de l'activation microgliale : la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), une maladie de la rétine provoquée par une dégénérescence progressive de la macula, partie centrale de la rétine, qui apparaît le plus souvent à partir de 65 ans. Elle touche un peu plus de 15% de la population au-dessus de 70 ans. Il existe deux formes de DMLA : atrophique et exsudative. La forme atrophique ou « sèche » est essentiellement caractérisée par une dégénérescence rétinienne responsable de la perte de vision irréversible. La forme exsudative (ou "humide") correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau de la choroïde qui, à terme, peuvent provoquer des hémorragies sous-réiniennes et accélérer l'évolution vers la cécité.

Les causes précises de cette maladie ne sont pas connues et les mécanismes peu décryptés. Cependant, il a récemment été mis en évidence dans la DMLA, une accumulation de cellules inflammatoires – cellules microgliales et monocytes - dans l'espace sous rétinien. Cet espace, situé entre l'épithélium pigmentaire (EP) et les photorécepteurs, est physiologiquement dépourvu de cellules immunitaires (privilège immun médié par l'EP). Ces cellules auraient un rôle pathogène sur la rétine, entraînant une perte définitive des photorécepteurs, menant à la cécité.

La L-DOPA, par son action activatrice sur la microglie cérébrale et donc probablement rétinienne, pourrait favoriser le recrutement immun visible dans la DMLA et par la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires, rendre ces cellules plus résistantes à leur élimination par l'EP.

Pour expliquer le lien qu'il peut y avoir entre la prise de L-DOPA et la DMLA, des modèles cellulaires et animaux doivent être expérimentés afin d'explorer les voies pro-inflammatoires possiblement activées par la L-DOPA. L'étude de modèles de souris mimant une DMLA, traitées ou non traitées par L-DOPA, permettra de mieux comprendre le rôle de cette voie dans le développement de la DMLA. Le nombre total de souris utilisées pour ce projet sur 5 ans sera de 1080 souris.

Les procédures expérimentales seront regroupées dans la mesure du possible pour ne pas multiplier les groupes d'animaux contrôles. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et par le personnel qualifié de l'animalerie. Toutes les souris ont à disposition des nids en cellulose et des bâtons à ronger. Si nécessaire (exemple : agressivité des mâles), des maisonnettes en carton seront introduites dans les cages d'hébergement.

L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet ; la DMLA est le résultat d'une interaction complexe entre différents types cellulaires juxtaposés et ne peut être complètement modélisée par

des modèles cellulaires *in vitro*. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Ils bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale. Pour les procédures de chirurgies, la douleur sera prévenue par administration d'opioïdes en pré et post opératoire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien-être.

11938 L'équipe s'intéresse aux bases neurales de la navigation spatiale. Lorsque nous faisons un voyage familial, nous nous identifions aux objets présents autour de nous, mais aussi aux mouvements de notre propre corps. Nous sommes ainsi capables de représenter notre corps dans l'espace tout en bougeant. Cette carte mentale est formée par l'action de nombreuses structures cérébrales qui interagissent les unes avec les autres et nous permettent d'avancer vers un but de manière optimale. Nous avons ainsi montré que le cervelet intervient dans la construction mentale de la représentation de l'espace dont le siège est au niveau de l'hippocampe. Nous cherchons maintenant à clarifier les mécanismes par lesquels le cervelet participe à la représentation mentale de l'environnement lors d'une tâche de navigation spatiale. Pour cela nous réaliserons des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* lorsque l'animal est en train de s'orienter dans l'espace. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 250 souris. La règle des 3R a été prise en compte pour la mise en œuvre du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement, les procédures tiennent compte des temps de récupération et du nombre de tests pour réduire le stress et la fatigue des animaux. Des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux (injection d'antalgiques ou bien mise à mort par injection d'une surdose d'anesthésique). ; 3) remplacement, les études *in vitro* et les animaux invertébrés ne permettent pas l'étude des comportements complexes ; le rongeur est donc l'espèce la plus appropriée pour ce type d'études.

11939 Le projet de recherche s'intéresse à étudier les facteurs qui influencent la carcinogénèse colorectale chez la souris immunocompétente. L'objectif est d'étudier la cinétique d'apparition des tumeurs coliques et les différences de croissance tumorale liées au sexe. Cette expérimentation est un pré-requis pour l'utilisation ultérieure de modèles génétiquement modifiés, afin de comprendre les facteurs qui influencent le développement de tumeurs colorectales, leur croissance et l'apparition des métastases.

La présente saisine concerne donc un maximum de 20 souris, 10 mâles et 10 femelles, qui seront étudiées par échographie exclusivement. Les dommages attendus sont liés à l'apparition de tumeurs colorectales.

Ce projet sera mené conformément à la règle des 3R : examens d'imagerie non invasive sur animaux anesthésiés, qui ne susciteront pas de stress important à l'animal (raffiner). Le nombre d'animaux sera réduit au minimum avec 20 souris maximum qui seront utilisées (réduire).

Le développement de modèles animaux reste nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de modèles représentatifs de la complexité d'un organisme entier ni de cette pathologie (remplacer).

11940 L'exposition des valves cardiaques à la sérotonine (5HT), sécrétée par certaines tumeurs du foie, est à l'origine de la survenue d'une atteinte cardiaque dite carcinoïde. Il s'agit d'une maladie associée à un taux de mortalité élevé chez l'homme. La 5HT produite par la tumeur va entraîner des modifications majeures de la structure des valves cardiaques. A ce jour, il n'existe aucun traitement pharmacologique efficace pour traiter cette atteinte carcinoïde cardiaque, et le seul traitement est le remplacement de la valve lors d'une chirurgie cardiaque. La création d'un modèle expérimental de souris ayant une atteinte cardiaque carcinoïde, non développé à ce jour, permettra d'évaluer l'efficacité de traitements pharmacologiques, avant de les tester chez l'homme.

Objectifs : Créer un modèle de souris dans lequel une tumeur du foie produit de la 5HT, entraînant une modification de la structure des valves cardiaques.

Méthodologie : Nous implanterons par intervention chirurgicale sous anesthésie dans le foie de souris des cellules tumorales produisant de la 5HT. Une analyse histologique des valves sera réalisée après sacrifice des souris. Nous utiliserons le nombre minimal de souris pour ce projet soit 36 souris (18 mâles et 18 femelles) déterminé statistiquement. La douleur sera prise en charge en post-opératoire par administration d'antalgiques.

Ce projet permettra de reproduire précisément la physiopathologie de l'atteinte cardiaque carcinoïde et d'exploiter ce modèle pour des travaux précliniques. La mise en évidence de l'efficacité de divers traitements pharmacologiques chez la souris justifierait un essai clinique chez l'homme.

La règle des 3R sera respectée.

La valvulopathie carcinoïde est un processus complexe faisant intervenir plusieurs organes et types cellulaires, et l'étude de l'impact sur les valves de la production excessive de 5HT ne peut donc se faire que sur des organismes vivants, comme les souris, et ne permet pas le remplacement par des études *in vitro*. Nous développons en parallèle une approche expérimentale basée sur l'analyse d'échantillons prélevés chez l'homme. Cette approche est néanmoins observationnelle et ne permettra pas de répondre à la question de l'efficacité de traitements pharmacologiques sur le traitement de la valvulopathie carcinoïde. Ainsi, ce projet s'inscrit dans une perspective de développement clinique chez l'homme, et il est donc indispensable d'avoir des données préliminaires avec un modèle animal.

Afin de respecter le principe de raffinement, les animaux seront observés tous les jours par les membres qualifiés de l'animalerie et tout comportement anormal sera directement communiqué à la personne responsable du projet. De plus, les animaux seront observés quotidiennement par les expérimentateurs confirmés responsables du projet connaissant bien les modèles utilisés. Enfin, les animaux sont maintenus sans isolement, avec enrichissement. Les interventions chirurgicales sont réalisées sous anesthésie, et les souris sont alors placées sous une lampe chauffante jusqu'à leur réveil. Dès l'apparition des points limites, les animaux seront euthanasiés. En l'absence d'atteinte de point limite, les animaux seront euthanasiés à 3,6 et 9 semaines (3 groupes de souris, sacrifiées à des temps différents) après l'implantation des cellules en vue de l'analyse histologique des valves.

Une durée de 3 ans est prévue pour cette étude.

11941 Le cancer constitue un problème de santé publique majeur. La compréhension des mécanismes mis en jeu dans la progression tumorale et la mise au point de nouvelles stratégies tumorales font partie des grands enjeux scientifiques actuels. Parmi les mécanismes mis en jeu, l'angiogenèse joue un rôle majeur dans la croissance tumorale, la dissémination métastatique et la réponse aux traitements.

Par ailleurs, le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas encore possible dans le domaine de l'oncologie. En effet, le développement d'une tumeur et de sa vascularisation sont des mécanismes complexes impliquant l'interaction entre de nombreux types cellulaires (cellules tumorales, endothéliales, stromales) et nombreux composants matriciels (collagène, fibronectine, protéoglycanes, etc), qui, pour être modélisés sur de réelles bases physiologiques et structurales, nous obligent de réaliser ces études chez l'animal. La réalisation de ce protocole nécessitera au maximum 738 souris. Il s'agit là d'une appréciation globale du nombre d'animaux mais les expérimentations seront menées sous forme de séries consécutives afin d'ajuster le nombre d'animaux nécessaires en fonction des résultats observés (Réduction). En conformité avec la règle des 3R, le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur, imagerie), et mises à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement).

De plus, nous utiliserons des techniques d'imagerie non invasive permettant de réduire les souffrances de l'animal (Raffinement) et le nombre d'animaux en réalisant des images de la tumeur et de la vascularisation tumorale dans le temps sur un même animal (Réduction).

La réalisation de ce projet d'expérimentation animale permettra de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'élaboration de l'angiogenèse tumorale et d'évaluer le rôle anti-tumoral de certains composés pharmacologiques.

11942 La température du corps des mammifères est régulée, mais peut varier, par exemple de façon systémique lors de la fièvre, ou localement dans des zones inflammatoires. La température est capable d'influencer de nombreuses réponses inflammatoires, en affectant la biologie des cellules du système immunitaire ou de l'arbre vasculaire. Cependant, il est impossible à ce jour de tester l'effet de la température sans que d'autres paramètres biologiques soient affectés. Notre objectif est de mettre au point un nouveau modèle expérimental chez la souris permettant d'induire une augmentation locale de la température autour de deux organes distincts : le ganglion lymphatique (ou la réponse immunitaire spécifique contre les pathogènes est induite) ou les artères.

Plus généralement, nous cherchons à comprendre l'effet d'une élévation locale de la température sur le système immunitaire d'une part, et sur la réponse des cellules artérielles d'autre part. Outre son intérêt fondamental, ceci permettra à terme de développer de nouveaux outils thérapeutiques visant à moduler la réponse cellulaire à la température, par exemple pour améliorer la réponse immunitaire dans la vaccination, pour altérer la réponse immunitaire dans des maladies inflammatoires chroniques, ou pour prévenir les maladies cardio-vasculaires comme l'athérosclérose.

Nous avons mis au point d'un dispositif biologique qui chauffe lorsqu'il est soumis à un champ magnétique. Ce dispositif sera implanté à des souris près des ganglions lymphatiques ou des artères par chirurgie, sous anesthésie et avec analgésie. Deux à 4 semaines plus tard, les souris seront anesthésiées, et placées dans un IRM permettant d'induire et de mesurer l'élévation de température. Ceci permettra d'établir la preuve de concept que le dispositif permet de faire chauffer localement les souris. La procédure à l'IRM pourra être répétée jusqu'à trois fois, avec un intervalle d'au moins une journée entre chaque séance. Le but est d'induire une élévation locale de température modérée (entre 1 et 3 degré) qui ne devrait pas induire de douleur.

Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser 10 souris au total, sur une période de 2 ans, en respectant le principe des 3R. Remplacement : cette étude est basée sur des expériences *in vitro* qui ont montré que la température avait un impact majeur sur le système immunitaire et les cellules vasculaires. Cependant, la réponse cellulaire à la température implique le dialogue entre de nombreux types cellulaires et avec leur environnement stromal. Il est donc essentiel de pouvoir étudier l'effet d'une élévation locale de la température *in vivo*, dans un modèle animal. Réduction : Cette étude est une mise au point, et nous utiliserons donc un nombre limité d'animaux permettant de faire la preuve de concept de la possibilité d'induire une élévation locale de température par implantation de notre dispositif chez la souris. Raffinement : Les animaux sont placés dans des cages avec enrichissement, sans isolement, et sont observés tous les jours par les membres qualifiés de l'animalerie ; tout comportement anormal est directement communiqué à l'une des personnes responsables du projet. L'imagerie par IRM est réalisée sous anesthésie et n'est pas invasive. Suite à la chirurgie et l'induction de température par IRM, la douleur des animaux sera évaluée à l'aide d'une grille de scoring (perte de poids, agressivité, prostration, poil hérissé, dos rond, difficulté à poser la patte). En cas d'un scoring de 2 ou 3, un analgésique sera administré aux animaux. Si l'état des animaux ne s'améliore pas dans les 3 jours suivants, les animaux seront euthanasiés. En cas d'un scoring de 4 ou plus, les animaux seront euthanasiés.

11943 De nos jours, il est admis que le surpoids et l'obésité sont des problèmes de santé publique majeure du fait de leur impact sur la population. En 2012 environ 32% de la population française adulte était en surpoids et la prévalence de l'obésité était de 15% avec une progression préoccupante. Associées aux problèmes du surpoids et d'obésité, une augmentation des pathologies liées à ces états ont également été observés (pathologies cardiovasculaires, cancers...). Actuellement, la prise

en charge médicale initiale du surpoids et de l'obésité consiste en des changements drastiques de mode de vie, comprenant des régimes hypocaloriques, une activité physique et éventuellement des traitements pharmacologiques, encadrés par une thérapie comportementale. Cette gestion de la prise en charge longtemps jugée comme idéale semble inefficace sur le long terme même associée à un traitement pharmacologique. Le seul traitement efficace dans le cas de l'obésité et le traitement chirurgical (pose d'un anneau gastrique ou chirurgie bariatrique) mais là encore cette méthode induit des changements drastiques chez les patients que ce soit dans leur vie de tous les jours ou au niveau biologique. Bien que de nombreuses hypothèses aient été avancées comme facteur causal du surpoids et l'obésité, aucun concept clair n'a encore émergé. Des données récentes ont montré l'importance du microbiote intestinal dans la régulation du stockage et de l'absorption des graisses. Par ailleurs depuis 2006, de nombreuses études ont montré que la flore intestinale a un rôle déterminant dans la prise de poids et le volume corporel du tissu adipeux. De plus, d'autres études plus récentes ont démontrées que les bactéries de la flore commensale étaient capables de produire des protéines ayant des séquences d'acides aminés similaires à celles des peptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et ainsi influencer de manière directe ou non sur la consommation alimentaire. Ainsi, les buts et objectifs de ces études sont de tester la capacité des protéines bactériennes ayant des séquences d'acides aminés similaires avec les peptides anorexigènes afin d'inhiber la prise alimentaire des patients en surpoids et obèses. Effets de ces protéines sur le comportement alimentaire seront testé sur 2500 souris et rats. De plus, l'utilisation de ces protéines pourrait permettre de restaurer une prise alimentaire plus favorable au maintien d'un poids et d'une masse adipeuse normaux.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3R pour les raisons suivantes : (i) la souris et le rat sont les espèces les plus étudié dans le domaine des troubles du comportement alimentaire, compte tenu de leur physiologie ; (ii) le nombre d'animaux a été calculé grâce au test d'analyse de puissance statistique ; (iii) le nombre de groupes d'animaux des études *in silico* ont été réalisées afin d'identifier des souches bactériennes produisant des protéines ayant un mimétisme avec les peptides anorexigènes. De plus des études protéomiques ont été réalisées afin d'identifier ces protéines mimétiques ; (iv) le bien-être des animaux sera suivi par du personnel formé quotidiennement 5/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés.

11944 Les plaquettes sont nécessaires à la coagulation sanguine. Les pathologies touchant les plaquettes nécessitent un suivi rapproché des patients et ont des conséquences médicales et socio-économiques non-négligeables. L'altération des fonctions plaquettaires peut entraîner une thrombose artérielle (crise cardiaque, accident vasculaire cérébral) ou une hémorragie. Des mutations dans différents gènes régulant la production des plaquettes sont responsables des défauts du nombre plaquettaire ainsi que de défauts fonctionnels. Elles aboutissent soit à une hyperproduction (thrombocytémie) ou à une hypoproduction (thrombopénie) de plaquettes.

Nous nous intéressons à l'étude des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la formation et le fonctionnement des plaquettes dans le cadre de plusieurs mutations retrouvées chez l'homme. Ainsi, nous pourrons étudier leur impact chez la souris en évaluant les processus thrombotiques et hémorragiques pour mieux comprendre la survenue de pathologies chez l'homme. Précisément, nous étudions la filaminopathie A, le syndrome MYH9, le syndrome Bernard-Soulier, le syndrome des plaquettes grise, la thrombocytopénie 2 (mutations dans 2 gènes différents), la thrombocytopénie 4. De plus, nous nous intéressons à la thrombocytémie essentielle (TE), une surproduction de plaquettes dans le sang. Enfin, nous pourrons tester des drogues corrigeant le défaut plaquettaire dans un objectif thérapeutique sur le plus long terme.

Bien que les plaquettes soient étudiées chez les patients, il est rarement possible d'étudier toutes les étapes dérégulées et aboutissant à la pathologie. Ainsi, il est difficile de les étudier chez l'homme. Nous sommes donc contraints de travailler sur souris afin de comprendre le dysfonctionnement dans la production plaquettaire dans les thrombopénies héréditaires qui sont des maladies rares. Cela est possible uniquement sur un modèle animal avec un suivi sur une durée prolongée. Par ailleurs, pour bien comprendre les mécanismes sous-jacents à la pathologie, il est

important de les valider sur un nombre de sujets valable sur le plan statistique, possible uniquement sur le modèle animal.

De plus, nous nous intéressons, dans chaque pathologie étudiée, à la dérégulation de la thrombose qui peut être étudiée uniquement *in vivo*.

Notre deuxième axe de recherche a pour but d'optimiser l'obtention de plaquettes *in vitro*. En effet, nous cherchons à développer une lignée de progéniteurs mégacaryocytaires qui permettront de produire une grande quantité de plaquettes et de tester des drogues dans un but d'utilisation clinique. Bien que nous sachions produire des plaquettes en culture, il est important de mettre au point un outil permettant de les produire en nombre important. Cette démarche s'inscrit dans une logique de remplacement d'animaux sur le long terme. Ainsi, nous voulons utiliser des cellules souches pluripotentes dites cellules IPS dans le but de produire des plaquettes. Ces plaquettes pourront servir pour des tests toxicologiques (remplacement). Toutefois, avant de les utiliser en toxicologie, il faut valider la capacité de ces plaquettes à faire une thrombose chez la souris ce qui constitue un des objectifs de ce projet. Les souris seront immunodéficientes pour éviter un rejet des plaquettes injectées. Ces souris immunodéficientes seront manipulées en conditions de confinement adaptées à leur statut immunitaire afin d'éviter des contaminations. Nous réaliserons des prélèvements sanguins sur la souris. Nous remplacerons le volume de sang prélevé par un volume équivalent de liquide physiologique. Les animaux hébergés dans l'animalerie bénéficient d'un environnement enrichi. Nos expérimentations sur la souris se déroulent dans une logique de la réduction du nombre d'animaux, avec la volonté de les remplacer au maximum, tout en veillant au bien-être animal pendant les procédures expérimentales.

Nous allons donc générer des mégakaryocytes à partir de cellules IPS et les multiplier et tester dans des souris greffées. Ainsi, nous allons tester 30 lignées de mégacaryocytes générées au laboratoire et portant différentes mutations. Pour étudier ces lignées, un total de 1530 animaux au maximum sera nécessaire.

11945 L'association forte entre obésité/diabète et cancer, observée dans de nombreuses études, reste à explorer mécaniquement. Parmi les différents mécanismes proposés, l'inflammation dépendante du tissu adipeux apparaît comme le plus probable.

Nous proposons d'étudier l'implication d'une voie de l'immunité innée capable de détecter les acides nucléiques cytosoliques (dont la protéine STING est l'acteur principal), dans l'inflammation chronique du tissu adipeux obèse.

Nous étudierons l'activation de cette voie chez la souris obèse après régime gras pour démontrer le lien entre cette activation dans le tissu adipeux et la progression du cancer du pancréas, notre modèle d'étude.

Dans ce projet, 4 approches complémentaires (procédures) seront utilisées pour évaluer l'activation de la voie STING, suite à la détection d'acides nucléiques cytoplasmiques, dans le tissu adipeux au cours de l'obésité et son impact sur la croissance tumorale ainsi que l'effet de l'activation de cette voie sur l'efficacité d'une chimiothérapie classique.

1. L'effet de l'obésité sur l'activation de la voie STING sera évalué par mise sous régime gras de souris contrôles et STING délétées.

Nous évaluerons également l'effet métabolique du régime sur ces souris (prise de poids, sensibilité à l'insuline, résistance au glucose) ainsi que l'inflammation STING-dépendante du tissu adipeux.

2. L'effet de la présence ou l'absence de STING en l'environnement ou dans les cellules cancéreuses au cours d'un régime gras sur la croissance tumorale.

3. L'effet de la modulation de STING par voie pharmacologique sur la croissance tumorale.

4. L'effet de la modulation de l'activité de STING sur une chimiothérapie classique.

Durant ce projet nous suivrons le principe des 3R qui consiste à remplacer (expériences *in vitro* quand cela est possible), réduire (diminuer le nombre d'animaux au minimum indispensable) et raffiner (prise en compte de la douleur, amélioration de l'hébergement, diminution du stress...). Pour cela nous avons mis en place une lignée *in vitro* d'adipocytes et de cellules cancéreuses

pancréatiques afin d'étudier le lien entre obésité et cancer dans le cadre de notre projet. Une étude statistique préalable et un nombre adapté de souris par groupe expérimental nous permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés. Et enfin un suivi hebdomadaire des animaux, une prise en compte de la douleur (grille d'évaluation de la douleur/utilisation d'analgésique) lors des chirurgies/expériences (anesthésie, analgésie, établissement de points limites spécifiques de la tumeur pancréatique) et des besoins biologiques et sociaux des animaux nous permettent de raffiner notre projet.

Au maximum 564 souris pourront être utilisées pour ces 4 procédures.

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant pour obtenir un résultat statistiquement significatif (exigence de réduction).

Le nombre de souris par groupe est fixé selon le nombre nécessaire de souris par procédure (expérience antérieure de l'expérimentateur et complexité de la procédure).

Toutes les expériences sont menées par du personnel formé et compétent. Ces études découlent de premiers résultats *in vitro* et *in vivo* non publiés et réalisés au sein du laboratoire.

Les souris seront surveillées quotidiennement, ceci dans le but de :

- suivre le développement de la tumeur.
- détecter le moindre signe de souffrance et/ou de détresse de l'animal (exigence de raffinement).

Après injection des cellules tumorales, les animaux sont surveillés quotidiennement et pesés 2 fois par semaine.

Des points limites ont été définis dans le cadre de nos expériences et celles de nos collaborateurs. Dès qu'un animal présente un de ces points limites, il sera pris en charge immédiatement.

11946 Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) est un problème de santé publique majeur de par sa prévalence élevée, dans la population générale, elle est estimée à environ 2% chez la femme et 4% chez l'homme. La prévalence augmente après la ménopause. Des études épidémiologiques ont mis en évidence que l'obésité est un facteur important du SAOS. Le SAOS est caractérisé par des occlusions partielles ou totales des voies aériennes supérieures (VAS) pendant le sommeil. Cette obstruction est liée à une relaxation inappropriée des muscles dilatateurs des VAS. Les patients présentent également une somnolence diurne excessive. Les traitements typiques incluent de la pression positive continue, des appareils oraux, des interventions chirurgicales modifiant les VAS, et/ou la perte de poids ; il n'existe pas de traitement pharmacologique. Le projet a pour objectif, dans une logique translationnelle, de caractériser les mécanismes associés à la mise en place du SAOS en s'appuyant sur des modèles de rongeurs. Les systèmes sérotoninergiques et les hormones sexuelles seront au cœur de nos investigations. Ce projet vise à développer et caractériser la neuroplasticité respiratoire mise en place sur un modèle chronique de rongeurs SAOS en vue d'identifier des cibles pharmacologiques potentielles utilisables pour le traitement du SAOS.

Les résultats obtenus devraient contribuer à mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le contrôle central des voies aériennes supérieures. Une meilleure compréhension de l'implication des systèmes sérotoninergiques et des hormones sexuelles, pourrait être un moyen de mieux « phénotyper » les patients et dans le futur offrir une prise en charge plus ciblée.

Notre projet visera à comprendre les mécanismes de neuroplasticité mis en place chez un modèle rongeur de SAOS induit par une hypoxie chronique intermittente en comparaison de leurs contrôles soumis à un protocole d'air intermittent en discriminant les individus selon leur genre. Ce projet nécessitera l'utilisation d'un total de 128 souris sur une période de 5 ans. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, le design des expériences comportementales et des expériences de physiologie a été calculé au plus juste, en tenant compte de la puissance des analyses statistiques. Dans la mesure du possible, le remplacement des animaux par des méthodes alternatives (modèles mathématiques, méthodes *in vitro* ...) est préféré.

Toutefois, vu la nature de nos recherches, l'utilisation de rongeurs reste nécessaire. Enfin, le raffinement des méthodes expérimentales visant à réduire à son maximum la souffrance animale est mise en œuvre grâce à l'utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques appropriés lors de chirurgies, à la mise en place de soins post-opératoires et de points limites clairement établis. Les expériences seront menées par des personnels hautement qualifiés dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur.

11947 Le cerveau est un organe extraordinairement complexe qui se développe au début de la vie embryonnaire. Le développement du cerveau résulte de l'exécution de programmes génétiques et cellulaires finement régulés. Des altérations de ces programmes peuvent conduire à des maladies psychiatriques et notamment l'autisme ou la schizophrénie. Des travaux ont montré qu'un déséquilibre des axes de communication entre le système immunitaire et le cerveau pourraient participer au développement et à la maintenance des désordres comportementaux observés dans les pathologies psychiatriques. Un enjeu majeur est de comprendre les mécanismes impliqués dans leur développement, pour à terme parvenir à les contrecarrer. Disséquer les modifications chimiques et fonctionnelles du système nerveux central et trouver de nouvelles cibles pour le développement futur de thérapies implique le recours à l'expérimentation animale.

Dans ce projet, nous étudierons le rôle des cytokines, petites molécules sécrétées par le système immunitaire dans le développement d'anomalies du neurodéveloppement et du comportement. Nous avons identifié des cytokines candidates d'intérêt dans le contexte d'analyses de biomarqueurs circulants dans des cohortes de patients autistes et schizophrènes. Nous testerons maintenant l'effet sur le comportement de la souris de traitements chroniques avec ces cytokines candidates ou bien des anticorps neutralisant ces cytokines dans un contexte non pathologique (souris sauvage) et dans deux modèles de schizophrénie (souris traitées chroniquement à la kétamine ou au à la phéncyclidine (PCP)).

Nous appliquerons la règle des 3 R :

Remplacer : En parallèle des expérimentations sur l'animal, nous effectuons des expériences *in vitro* dans des lignées cellulaires pour tester l'effet des molécules du système immunitaire identifiées et valider l'approche thérapeutique les ciblant.

Raffiner : Nos conditions d'élevage impliquent : stabulation par 4-6 animaux, enrichissement du milieu, température et hygrométrie contrôlée et suivi quotidien des animaux. La majorité des procédures pourront générer un inconfort faible et de courte durée, mais non dommageable pour l'animal. Pour les procédures compromettant le bien-être de l'animal, un suivi sous forme de grille de score (fournie en annexe) permettra de détecter une souffrance potentielle et de décider du devenir de l'animal au cours de l'expérimentation, notamment par la mise en œuvre de points limites précoces et adaptés.

Réduire : Nous utiliserons des tailles d'échantillon garantissant une puissance statistique suffisante pour l'analyse des résultats de comportement. Ainsi, des calculs de puissance réalisés avec un logiciel dédié ont permis de déterminer au plus juste les effectifs de groupe à utiliser pour observer des effets avec les tests statistiques adéquats.

Un total de 2506 animaux est requis pour ce projet.

11948 La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie très fréquente et invalidante pour laquelle il n'existe pas de traitement donnant une réponse clinique à long terme.

Cette pathologie auto-immune induit une inflammation chronique des articulations chez les patients, avec une érosion osseuse et une déformation irréversible des articulations. Il existe plusieurs stratégies de traitement de cette pathologie, mais aucune ne permet une stabilisation complète à long terme et encore moins une rémission. La première ligne de traitement consiste en l'administration de méthotrexate (MTX) associé ou non à des inhibiteurs de cytokines inflammatoires. De nombreux patients finissent néanmoins par "échapper" au traitement. Pour cette raison, de nombreuses recherches sont actuellement en cours pour identifier de nouvelles stratégies de traitement.

Le projet vise à valider de nouveaux agents thérapeutiques pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde grâce à l'emploi de nanoparticules lipidiques ciblant spécifiquement les macrophages activés (cellules du système immunitaire). Ce projet s'inscrit dans la suite d'un projet européen et vise à réaliser la preuve de concept du ciblage des macrophages par imagerie *in vivo*.

Les travaux seront menés chez la souris saine et dans un modèle murin de polyarthrite. Les dommages attendus sont liés à l'apparition potentielle de douleurs liées au développement de l'arthrite. Une bonne connaissance du modèle ainsi que la mise en place de points limites prédictifs permettront d'anticiper toute douleur ou souffrance infligée aux souris.

Dans ce contexte, le nombre d'animaux mis en œuvre sera limité au minimum permettant d'exploiter les résultats de façon pertinente (Réduire). Les approches par imagerie *in vivo* sont non invasives sous anesthésie générale, et permettent de limiter le stress infligé aux animaux (Raffiner). L'étude de la biodistribution de composés à visée thérapeutique ne peut malheureusement pas se faire *in vitro* car il n'existe pas à ce jour de modèle traduisant la complexité d'un organisme entier *in vitro* et sera menée chez la souris (Remplacer).

Au total nous estimons que 42 souris seront utilisées dans ce projet. L'objectif attendu est le démarrage d'une étude clinique d'ici 2 à 3 ans, prévue dans le projet européen.

11949 L'objectif de ce projet est de tester le caractère souche de sous-populations de spermatogonies de petite roussette. Une culture *in vitro* de ces cellules a été établie mais une démonstration *in vivo* de leur caractère souche s'avère indispensable.

Une approche classique pour tester le caractère souche de spermatogonies de poissons consiste à évaluer leur capacité à coloniser la gonade d'un receveur suite à une transplantation. Les cellules, préalablement marquées, sont injectées dans la cavité intra-péritonéale d'embryons et suivies au cours du développement. Les injections seront réalisées à 6 semaines soit durant le premier tiers du développement embryonnaire. Afin de réduire le nombre d'embryons nécessaire, 825, de nombreuses mises au point ont été réalisées (marquage et analyse en cytométrie des cellules, étude du développement de la gonade) avec notamment une étape de culture *in vitro* permettant d'optimiser la transplantation. De plus, chaque embryon sera l'objet de multiples analyses (histologique, immunohistochimique) pour diminuer le nombre d'animaux utilisés. La maîtrise des injections dans les embryons et le maintien de ceux-ci dans des conditions optimisées bénéficiera des compétences acquises auprès d'une spécialiste du développement de la petite roussette. Lors de la transplantation, l'embryon sera maintenu dans son oeuf (capsule conservée) et anesthésié dans un bain de 2-phénoxyéthanol. Ces expériences de transplantation de spermatogonies dans des embryons de petite roussette démontreront le caractère souche des cellules cultivées et renforceront la valeur de ce modèle *in vitro* pour des utilisations futures. Ce modèle *in vitro* permettra une amplification et une conservation des cellules et réduira le recours à des animaux adultes pour des cultures primaires.

11950 Le but du projet est d'induire par le biais du DSS (Dextran Sodium Sulfate) ou TNBS (2,4,6-trinitrobenzène sulfonate) une inflammation au niveau de l'intestin chez la souris afin d'étudier des cibles thérapeutiques. 250 000 personnes sont atteintes en France d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin. Ces maladies digestives sont des maladies dont on ne guérit pas aujourd'hui. Le DSS est une substance corrosive et irritante qui va créer des lésions au niveau de la barrière intestinale. Administré quotidiennement aux animaux, le DSS provoque une très forte inflammation intestinale accompagnée d'ulcération et de diarrhées hémorragiques. Ce modèle d'inflammation est particulièrement utilisé pour cibler les mécanismes inflammatoires au niveau de l'intestin.

Le TNBS est une solution acide qui induit une inflammation du colon très reproductible. Administré aux souris, le TNBS brise la barrière intestinale et pénètre dans la paroi de l'intestin. Il va provoquer une inflammation sévère caractérisée par une perte de poids et des diarrhées hémorragiques. La pathologie induite par le TNBS mime la maladie de Crohn chez l'Homme. Cette pathologie, aux causes inconnues, ne bénéficie pas encore de traitement. Un modèle murin d'inflammation

intestinale est donc un bon modèle pour avancer sur la compréhension et le traitement de cette maladie.

La phase préclinique qui consiste à étudier l'action des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments à visée anti-inflammatoire.

Ce projet a pour but d'étudier l'effet de nouveaux agents pharmacologiques à caractère anti-inflammatoire dans un modèle de colite aiguë induite par l'administration de DSS (Dextran Sodium Sulfate) ou par l'administration d'un produit chimique : le TNBS (2.4.6-trinitrobenzene sulfonic acid).

Les traitements sont administrés avant (traitement préventif) ou après (traitement curatif) l'administration du DSS ou TNBS par voie orale, intra-péritonéale, sous cutanée ou intraveineuse.

Dans le modèle DSS, les souris sont pesées et un score de la maladie est effectué tous les jours. L'expérimentation dure 8 jours (maladie aiguë).

Dans le modèle TNBS, les souris sont pesées et un score de la maladie est effectué tous les jours. L'expérimentation dure 4 jours (maladie aiguë).

Le dernier jour de l'expérimentation, les souris sont mises à mort dans le but d'effectuer différents prélèvements. Le sang et le colon sont prélevés. Les poids et longueurs du colon sont relevés. Un score macroscopique est effectué sur le colon puis il est coupé en plusieurs portions afin d'effectuer des analyses telles que l'histologie, dosage de protéines, cytokines inflammatoires. Un suivi de poids journalier est effectué afin de vérifier l'état des souris et d'agir si elles souffrent trop ou perdent trop de poids.

Ce modèle induit des douleurs inflammatoires aiguës à l'animal, liées au développement de l'inflammation dans du colon.

Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée pendant la période d'expérimentation. Les conditions d'hébergement ; en portoir ventilé ; sont celles qui sont requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort par dislocation cervicale.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études : une étude comportant jusqu'à 90 animaux en fonction du nombre de molécules à tester et du nombre de concentration par molécules, soit 1800 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant l'inflammation du colon induit par le DSS ou TNBS. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

-Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

-Raffinement : Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum leur douleur au moment de l'expérimentation. Des points limites sont mis en place et appliqués afin de limiter la souffrance de l'animal (cf tableau points limites 3.4.13) et un cocktail anesthésique/analgésique est administré aux animaux.

-Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

11951 Dans la sphère cranio-faciale, les causes de pertes de substances osseuses peuvent être d'origine malformatives, traumatiques ou secondaires aux exérèses tumorales. Plusieurs procédés permettent de les restituer selon la taille du déficit : les greffes osseuses, les biomatériaux phosphocalciques ou encore les transplants micro-anastomosés. Les greffons autologues et les substituts osseux peuvent être utilisés de manière isolée ou combinée dans les terrains les plus favorables (défaut osseux limité, richesse médullaire environnante, éloignement des zones contaminées). L'étude chez l'animal a montré que l'association de biomatériaux phosphocalciques de type « Biphase Calcium Phosphate » (BCP) ou d'un autre biomatériau phosphocalcique (CaP) à de la moelle osseuse totale (MOT) permettait d'obtenir une néoformation osseuse mais sans

pouvoir égaler les techniques de greffe osseuse autologue. Nos travaux précédents, ont d'ailleurs montré l'intérêt d'associer une autogreffe de moelle osseuse totale (MOT) ou des cellules souches mésenchymateuses différenciées (SCM) à des BCP pour favoriser la repousse osseuse dans ce territoire à faible trophicité. Les résultats obtenus par ces associations étaient proches bien qu'inférieurs à ceux obtenus par la technique de référence (greffe autologue) responsable de morbidités et permettant la reconstruction de volumes limités. La réparation osseuse peut être compromise du fait de l'altération de l'environnement de la zone à régénérer (hypoplasie tissulaire, cicatrices), et/ou du fait du volume du greffon, qui n'est que lentement revascularisé et de manière centripète. L'utilisation de facteurs moléculaires (adjuvants) améliorant la régénération osseuse en terrain défavorable est une voie de recherche prometteuse pour pouvoir limiter le prélèvement osseux autologue ou l'utilisation de procédés chirurgicaux lourds pour les patients. L'association d'adjuvants aux biomatériaux peut ainsi avoir un rôle majeur dans l'amélioration des procédés d'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) en vue de se substituer aux prélèvements autologues chez le patient. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'intérêt de nouveaux biomatériaux phosphocalciques permettant une meilleur revascularisation et l'apport des adjuvants dans la régénération osseuse *in vivo* dans des modèles pré cliniques de défauts de calvaria (voûte crânienne) chez le rat Lewis. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'intérêt de nouveaux biomatériaux et l'association d'adjuvants pour la régénération osseuse des défauts de calvaria (voûte crânienne). Cette étude a donc pour but de montrer qu'il est possible d'améliorer un procédé d'ITO peropératoire afin d'éviter les techniques de greffe osseuse nécessitant un prélèvement osseux contraignant pour les patients en diminuant la morbidité de cette procédure. Afin de remplacer les modèles animaux, un travail de screening des biomatériaux a été effectuée en amont *in vitro* afin de sélectionner les meilleurs candidats à la reconstruction osseuse, puis afin de réduire de moitié le nombre de rats, 2 défauts de calvaria seront réalisés par animal. La réalisation de ces 2 défauts a montré une très bonne tolérance dans les expérimentations précédentes réalisées au sein du laboratoire. Cette étude se déroulera sur 5 ans et 120 rats seront nécessaires. Nous raffinerons les conditions d'hébergement des animaux par un enrichissement des milieux dans chaque cage, les animaux seront observés de manière quotidienne par les animaliers de l'unité expérimentale pour s'assurer du bien-être des animaux. Une analgésie sera donnée de façon systématique en per et post-opératoire ainsi qu'en cas de détection de signe de souffrance même mineure.

11952 Le cil est une excroissance de la membrane plasmique située à la surface des cellules. Il existe 2 types de cils dans l'organisme : les cils motiles, souvent multiples à la surface cellulaire, créent des mouvements grâce à leurs battements synchronisés (ex : épithélium des voies respiratoires). Les cils primaires, présents en unique exemplaire, sont des « antennes » qui intègrent et transmettent des signaux extracellulaires vers l'intérieur de la cellule (ex : le segment externe des photorécepteurs). Un problème de développement ou de fonctionnement du cil provoque des maladies appelées « les ciliopathies ».

Une mutation au niveau du gène *VPS15* a été identifiée comme responsable d'une ciliopathie ultra rare chez l'homme (une seule famille recensée). Les patients présentent une atteinte rénale sévère, une atteinte rétinienne ayant conduit à la cécité et des anomalies squelettiques. A ce jour, les voies cellulaires impliquées dans cette ciliopathie restent inconnues. Nous devons comprendre pourquoi et comment la mutation de ce gène conduit à ces anomalies.

Le projet porte sur une lignée de souris transgéniques, porteuses de la même mutation que les patients. *Vps15* est une protéine habituellement connue pour son implication dans le processus d'autophagie. L'objectif de ce projet est de comprendre l'implication de *Vps15* dans le fonctionnement du cil primaire (rôle récemment découvert). Nous voulons d'abord comprendre le rôle physiologique de *Vps15* dans les différents organes puis disséquer les mécanismes qui interviennent pour expliquer le phénotype de ciliopathie constaté. L'étude portera sur un grand nombre d'organes. Une attention particulière sera portée au rein et à l'œil, les 2 organes principalement touchés chez les patients :

- Les reins des souris femelles présentent des différences histologiques par rapport à ceux des mâles. Lors du traitement des données, nous ferons la distinction entre les 2 sexes pour cet organe.

Des analyses de sang et d'urines seront menées à des âges croissants entre 1 et 4 mois (n=6 souris par sexes et par génotypes).

- Les yeux des souris femelles et mâles ne présentent pas de différence notable. Nous inclurons autant d'animaux de chaque sexe et les résultats seront regroupés sans distinction. Des électrorétinogrammes (tests d'électrophysiologie sur animaux anesthésiés) et des optomoteurs (tests non invasifs) seront menés sur n=6 souris par sexes et par génotypes, à 1-4-8 mois.

- Une étude histologique sera menée sur les organes perfusés au paraformaldéhyde PFA 4% de n=6 souris par sexes et par génotypes, à 1-2-3-4 mois.

Dans le cadre de ce projet, un total de 158 souris (sexes et génotypes confondus) sera étudié. Le principe des 3R sera appliqué et respecté de la manière suivante :

- Remplacement : n'importe quel autre modèle alternatif (cellulaire, informatique...) ne permettrait l'étude de l'organisme de manière intégrée avec les relations entre les différents organes et la diversité cellulaire des tissus, à des âges croissants, comme chez la souris. L'application de tests électrophysiologiques tels que l'ERG ou l'optomoteur n'est possible qu'en ayant recours à un modèle animal.

- Réduction : les effectifs pris en compte pour la mise en place du projet correspondent au nombre minimal de souris à inclure pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et exploitables en appliquant un test de Student.

- Raffinement : les animaux seront hébergés dans un environnement en adéquation avec la réglementation européenne. A chaque visite journalière, nous contrôlerons la présence de nourriture et d'eau « *ad libitum* ». Nous nous assurerons du bien-être des animaux en contrôlant le pelage, l'aspect général des souris, leurs comportements individuels et vis-à-vis de leurs congénères.

11953 L'équipe s'intéresse aux bases neurales de la navigation spatiale. Lorsque nous effectuons un trajet familier nous nous repérons aux objets présents autour de nous mais également aux mouvements de notre propre corps. Nous sommes ainsi capables de nous représenter notre corps dans l'espace tout en nous déplaçant. Cette carte mentale est formée grâce à l'action de nombreuses structures cérébrales interagissant entre elles et nous permettant ainsi de nous déplacer vers un but de manière optimale. Nous avons ainsi montré que le cervelet intervient dans la construction mentale de la représentation de l'espace dont le siège se situe au niveau de l'hippocampe. Nous cherchons maintenant à clarifier les mécanismes permettant au cervelet de participer à cette représentation mentale. Pour cela nous utilisons des souris transgéniques dont les plasticités synaptiques du cervelet ont été modifiées et analysons les conséquences sur la représentation mentale du corps dans l'espace et sur les capacités à se diriger directement vers un but. Nous utiliserons pour cela au maximum 40 souris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux. Des anti-douleurs sont utilisés lors de la chirurgie ainsi que durant les 36h post-intervention ; 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes ; le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.

11954 Des travaux récents montrent l'implication de gènes du système immunitaire dans les atteintes des nerfs chez les patients diabétiques. L'objectif principal de ce projet est de comprendre le rôle de deux de ces gènes dans le fonctionnement des nerfs et dans les processus de maintien de la myéline (gaine isolante des nerfs).

Le projet consiste à analyser les conséquences de l'absence de ces gènes chez la souris adulte en condition normale ou pathologique (diabète ou compression du nerf sciatique). Pour cela, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées pour ces gènes. Les capacités locomotrices de ces souris seront évaluées à l'âge adulte grâce à des tests comportementaux non invasifs et indolores.

Nous analyserons pour cela la capacité des souris à explorer leur environnement, à se déplacer sur une barre horizontale... Nous évaluerons également la qualité de fonctionnement du nerf en mesurant la vitesse de conduction nerveuse sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance aux animaux. Nous mènerons des études biochimiques et histologiques sur les nerfs isolés. La même série de tests sera effectuée en parallèle avec des cohortes de souris qui auront subi une compression du nerf sciatique afin d'étudier le processus de régénération de la myéline. Cette procédure sera effectuée sous anesthésie générale et des anti-douleurs seront administrés pour éviter toute souffrance à l'animal.

Afin d'être en conformité avec les exigences des 3R, nous allons utiliser le minimum d'animaux en expérimentation en prélevant en post mortem le maximum de tissus biologiques sur chaque animal et en utilisant les tests statistiques appropriés afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Nous allons également raffiner l'étude en évitant des tests comportementaux douloureux, en réduisant la douleur en effectuant certaines expériences sur des cohortes d'animaux anesthésiés, en diminuant la durée de l'étude au maximum et en appliquant des points limites notamment la mise à mort des souris en cas de souffrance majeure. Enfin, en complément de ces études *in vivo*, nous utiliserons des méthodes *in vitro* de culture de cellules afin d'identifier les cibles de ces gènes, nous permettant de mieux comprendre leur rôle sur la myéline sans avoir besoin d'utiliser de nouveaux animaux. Au total nous avons besoin de 2128 animaux pour une étude qui s'étend sur 5 ans.

Une meilleure compréhension de l'importance de ces deux gènes permettrait le développement de nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement des atteintes neurologiques.

11955 La température du corps des mammifères est régulée, mais peut varier, par exemple de façon systémique lors de la fièvre, ou localement dans des zones inflammatoires. La température est capable d'influencer de nombreuses réponses inflammatoires, en affectant la biologie des cellules du système immunitaire ou de l'arbre vasculaire. Cependant, il est impossible à ce jour de tester l'effet de la température sans que d'autres paramètres biologiques soient affectés. L'objectif de cette étude est de mettre au point un nouveau modèle expérimental chez la souris permettant d'induire une augmentation locale de la température autour de deux organes distincts : le ganglion lymphatique (ou la réponse immunitaire spécifique contre les pathogènes est induite) ou les artères de conductance.

Notre but plus général est de comprendre l'effet d'une élévation locale de la température sur le système immunitaire d'une part, et sur la réponse des cellules artérielles d'autre part. Outre son intérêt fondamental, ceci permettra à terme de développer de nouveaux outils thérapeutiques visant à moduler la réponse cellulaire à la température, par exemple pour améliorer la réponse immunitaire dans la vaccination, pour altérer la réponse immunitaire dans des maladies inflammatoires chroniques, ou pour prévenir les maladies cardio-vasculaires comme l'athérosclérose.

Des souris seront opérées chirurgicalement sous anesthésie, avec analgésie, pour implanter un dispositif biologique dont la température peut être augmentée à distance lorsqu'il est soumis à un champ magnétique. Nous évaluerons pendant les 4 semaines suivantes si le dispositif induit une douleur aux souris par l'évaluation de points limites (voir plus bas), ainsi qu'une inflammation au bout de deux et quatre semaines. Nous testerons si nous sommes capables d'induire une élévation locale de la température par imagerie non invasive sous anesthésie à l'aide d'un IRM ou d'une caméra thermique. L'imagerie par caméra thermique ne sera réalisée qu'une fois par souris. L'imagerie par IRM sera réalisée au maximum trois fois par souris, avec un intervalle d'au moins une journée entre chaque imagerie, et les souris seront surveillées afin de détecter si l'induction de la température est douloureuse, auquel cas les souris recevront un analgésique en cas de douleur modérée, ou seront euthanasiées en cas de douleur sévère.

Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser 66 souris au total, sur une période de 2 ans, en respectant le principe des 3R. Remplacement : cette étude est basée sur des expériences *in vitro* qui ont montré que la température avait un impact majeur sur le système immunitaire et les cellules vasculaires. Cependant, la réponse cellulaire à la température implique le dialogue entre de nombreux types cellulaires et avec leur environnement stromal. Il est donc essentiel de pouvoir

étudier l'effet d'une élévation locale de la température *in vivo*, dans un modèle animal. Réduction : Cette étude est une mise au point, et nous utiliserons donc un nombre limité d'animaux permettant de faire la preuve de concept de la possibilité d'induire une élévation locale de température par implantation de notre dispositif chez la souris. Raffinement : Les animaux sont placés dans des cages avec enrichissement, sans isolement, et sont observés tous les jours par les membres qualifiés de l'animalerie ; tout comportement anormal est directement communiqué à l'une des personnes responsables du projet. La chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale, avec administration d'analgésie. À la suite de la chirurgie, ou de l'induction locale de température, les animaux seront observés tous les jours par les expérimentateurs confirmés responsables du projet afin d'évaluer et de limiter leur douleur éventuelle. Des points limites (perte de poids, agressivité, prostration, poil hérissé, dos rond) ont été établis afin d'établir un scoring de l'animal. En cas d'un scoring de 2 ou 3, un analgésique sera administré aux animaux. Si l'état des animaux ne s'améliore pas dans les 3 jours suivants, les animaux seront euthanasiés. En cas d'un scoring de 4 ou plus, les animaux seront euthanasiés.

11956 Les myopathies inflammatoires sont un ensemble de maladies graves caractérisées par une faiblesse musculaire, une élévation sérique des enzymes musculaires et la présence dans les muscles squelettiques d'un infiltrat cellulaire inflammatoire. Cliniquement ces pathologies peuvent se manifester de façon très différente d'un individu à l'autre. On distingue ainsi plusieurs groupes : la polymyosite, la dermatomyosite, la myosite à inclusions, mais aussi les myosites associées à certains auto-anticorps ou à une connectivite et les myopathies nécrosantes auto-immunes. Cependant, la physiopathologie de ces maladies est très mal connue, et les thérapeutiques utilisées sont donc peu ciblées. De plus aucun modèle animal n'a été développé à ce jour pour permettre les études cognitives indispensables à la compréhension des voies physiopathologiques mises en jeu et le développement de thérapeutiques ciblées.

La souris NOD (non obese diabetic), génétiquement susceptible aux maladies auto-immunes, développe un diabète de type 1 spontané. Récemment, nous avons développé deux lignées de souris NOD déficientes dans la voie de costimulation lymphocytaire ICOS/ICOSL (Souris NOD Icos^{-/-} et NOD Icosl^{-/-}). Ces souris sont protégées du diabète mais développent une myosite auto-immune spontanée (polymyosite) très proche de ce qui est observé chez l'Homme (faiblesse musculaire, nécrose/régénération myocytaire, infiltrat inflammatoire endomysial). Il s'agit donc d'un modèle nouveau et unique de polymyosite dans lequel nous proposons d'évaluer (i) le rôle du stress oxydatif chez la souris NOD Icos^{-/-} et (ii) d'une thérapie anti-oxydante. Ce projet s'appuie sur des données récentes de la littérature qui montrent dans un modèle murin par immunisation de dermatomyosite, le rôle du stress oxydatif et l'effet préventif de la N-acétylcystéine dans cette maladie.

Les résultats obtenus au cours d'une étude antérieure menée dans le laboratoire sur un autre modèle murin de myosite, nous permettent de mettre en place la procédure expérimentale en respectant le concept des 3R. Le nombre d'animaux nécessaires est de 96. Il est réduit au minimum en tenant compte de la variabilité des mesures de la force musculaire et de l'évaluation de la locomotion. Une échelle de gravité des symptômes observés a été établie et permet de déterminer un point limite dans l'ensemble des expériences. Elle permettra d'évaluer la douleur des animaux et de mettre en place une procédure visant à la limiter. Enfin, l'ensemble des expériences sera réalisé dans une animalerie agréée, où les conditions d'hébergement sont contrôlées : température, hygrométrie, cycle jour/nuit, change et nourriture. Les animaux seront euthanasiés par dislocation cervicale en fin de protocole.

11957 Notre projet de recherche s'intéresse à l'un des récepteurs de la sérotonine, le récepteur 5-HT7 (5HT7R). La sérotonine est un neurotransmetteur très important dans le fonctionnement de notre cerveau, permettant aux neurones de communiquer entre eux. Le récepteur ciblé dans notre projet, le 5HT7R semble très intéressant car il est localisé dans des zones cérébrales clés aux fonctions cognitives, comme la mémoire et l'apprentissage. De par sa localisation, ce récepteur est devenu une cible de plus en plus prometteuse pour le traitement de divers troubles neurologiques, comme la maladie d'Alzheimer et la Schizophrénie. Il semblerait que ce récepteur soit également présent

sur les chemins des mécanismes de douleur, au niveau de la moelle épinière. Ainsi plusieurs études ont montré l'intérêt d'utiliser des molécules activant ce récepteur, nommées agonistes, pour le traitement des douleurs aiguës mais aussi chroniques.

En collaboration avec des chimistes nous avons identifié et caractérisé de nouvelles molécules du récepteur. Des approches *in vitro* nous ont déjà permis de montrer que certaines d'entre elles agissent comme de puissants agonistes et sont dépourvus d'effet toxique cellulaire. Des études *in vivo* préliminaires ont révélé que ces composés possèdent des propriétés antidouleur dans un test de douleur modéré sur un temps court. L'objectif du projet est de poursuivre la caractérisation des propriétés anti-douleur de ces composés dans plusieurs tests de douleur, tous modérés et sur un temps court. Nos objectifs *in vivo* visent à 1) caractériser la spécificité d'action des molécules sur le récepteur 5-HT7 2) définir leurs effets sur le système nerveux central 3) définir les voies de signalisation intracellulaires impliquées.

La procédure mise en place dans ce projet comporte trois tests comportementaux, visant à évaluer une douleur modérée sur un temps court chez la souris, afin de déterminer les effets antidouleur des molécules chimiques.

Afin d'approfondir les effets antidouleur de 5 ligands chimiques du récepteur 5-HT7, observés au préalable par le prestataire de service, notre projet nécessitera l'utilisation de 500 souris. Nous évaluons à 100 souris, le nombre suffisant pour l'étude d'un ligand chimique et de son antagoniste (contrôle de la spécificité de l'agoniste) à une dose définie. Ainsi $100 \times 5 = 500$ souris.

Une attention particulière sera accordée au respect de la règle des 3R :

- Réduire : Les approches comportementales nécessitent des cohortes de 10 animaux minimum par groupe. Cette étude se focalisera sur 5 ligands à tester. Chaque expérience sera réalisée deux fois indépendamment afin d'assurer la validité statistique des résultats. Cependant, si une molécule s'avère inefficace dès la procédure 1, elle sera abandonnée.

- Remplacer : L'étude *in vivo* est indispensable à l'avancée de ce projet compte tenu de la complexité des mécanismes impliqués dans la douleur et des objectifs thérapeutiques que nous souhaiterions atteindre. La souris est un modèle de choix pour notre étude, en effet les mécanismes neurologiques et les neurotransmetteurs associés à la mise en place du message de douleur sont très similaires à ceux présents chez l'Homme.

Le choix de la dose à utiliser *in vivo* pour chaque ligand, sera basé sur les données obtenues à partir de cultures primaires de neurones.

- Raffiner : Les animaux seront suivis tout au long de la procédure et des trois tests comportementaux réalisés. En effet l'aspect général extérieur de l'animal (posture, pelage, démarche, faciès, yeux) seront observés, associés au suivi des critères évalués par la grille de score adaptée aux tests. Si des animaux présentent des signes de souffrance (point limite: score=2 pour un critère de la grille ou >4 pour l'ensemble des critères), ils seront retirés du groupe expérimental. Dans le cas où 2 animaux exclus font parti du même groupe expérimental (même traitement), alors ce groupe entier sera retiré de la procédure.

11958 Inscrite à l'Annexe I de la Directive Oiseaux et à l'Annexe II de la Convention de Berne, le Martin-pêcheur d'Europe (*Alcedo Atthis*) est une espèce méritant une vigilance accrue. La population européenne présente actuellement un statut de conservation défavorable en raison d'une importante chute de ses effectifs : déclin de 30 à 50% de la population depuis le début des années 2000. En France, l'espèce connaît également un fort déclin de la population, ce qui justifie, depuis 2016, son passage du statut de "préoccupation mineure" à celui de "vulnérable". L'espèce est en particulier confrontée à différentes pollutions des espaces qu'elle exploite, susceptibles d'affecter de manière significative l'état de santé des populations. Compte-tenu de ces constats, notre projet vise à évaluer à quels niveaux les Martin-Pêcheurs d'Europe peuvent potentiellement être exposés à différents polluants organiques par le biais de leur régime alimentaire et à appréhender les effets de cette exposition sur l'état de santé des populations de cette espèce actuellement en mauvais état de conservation. Le présent projet a pour objectif de documenter les niveaux de polluants organiques chroniquement ingérés par le biais des proies consommées par les individus afin

d'évaluer le niveau de contamination des ressources alimentaires exploitées par l'espèce. L'unique possibilité de conduire ce projet est de collecter au moyen de lavages stomacaux des regurgitas sur différents individus capturés dans la nature à l'occasion d'opérations de suivis par capture et marquage. Cette procédure offre l'avantage d'être simple, jugée peu intrusive dans la littérature scientifique et sans risques de dommages pour les animaux. Tout au long de la collecte des échantillons, l'état de stress des oiseaux sera surveillé afin de permettre aux opérateurs d'intervenir de manière immédiate et appropriée dès apparition d'un niveau de stress supérieur au stress inhérent à la manipulation classique d'un oiseau sauvage pour pose de bagues et la prise de mesures biométriques. Le nombre total de prélèvements se limitera à 5 prélèvements pour les adultes et 5 prélèvements pour les juvéniles sur un total de 6 secteurs géographiques, soit un total de 60 animaux échantillonnés pour l'ensemble du projet (30 adultes et 30 juvéniles). Ces effectifs correspondent à des minimas statistiques permettant d'appréhender les potentielles variations d'exposition des oiseaux aux polluants recherchés en fonction des zones de captures. Après collecte, les regurgitas seront broyés et lyophilisés pour dosages d'un total de 63 molécules identifiées par chromatographie en phase liquide à haute performance avec détection par spectrométrie de masse en tandem via une source électrospray.

11959 Notre groupe travaille sur la mise au point d'approches de thérapies cellulaires pour inhiber l'inflammation dans différentes pathologies. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) possèdent des propriétés anti-inflammatoires et trophiques qui les rendent particulièrement intéressantes pour mettre en place un traitement de ces maladies. Pour certaines pathologies, la mise en place d'essais cliniques est en cours et la réglementation sur les produits de thérapie cellulaire demande de renseigner la toxicité de ces cellules en fonction du procédé de production et/ou de la voie d'administration. Dans ce but, nous voulons déterminer leur toxicité après implantation chez la souris et déterminer si leur injection peut provoquer des effets indésirables.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer le devenir des cellules souches mésenchymateuses après implantation dans différents tissus. Nous utiliserons les CSM humaines ou leurs vésicules extracellulaires qui seront injectées, associées ou non à un biomatériau, en intra-articulaire, intraveineux, intra-hépatique ou sous-cutané chez des souris sans compétence immunitaire. Nous utilisons des cellules humaines qui seront produites aux normes BPL (bonnes pratiques de laboratoire) afin de disposer de résultats de toxicologie pour le dépôt de demande d'utilisation de MTI (médicament de thérapie innovante) aux instances réglementaires. S'agissant de cellules humaines, nous utiliserons des souris sans compétence immunitaire pour « mimer » l'injection de ses propres cellules au patient. L'intérêt de tester différentes voies d'injection est de déterminer une éventuelle toxicité des cellules, des vésicules extracellulaires ou du biomatériau associé aux cellules en fonction du site d'injection.

Nous avons déterminé un programme de travail sur les 5 ans à venir qui tient compte des avancées attendues de notre projet de recherche. Cependant, le nombre d'animaux concerné par chaque procédure est certainement maximal (maximum envisagé : 2520) et sera revu à la baisse si besoin pour tenir compte de la règle des 3R.

Toutes les dispositions seront prises pour respecter la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé avec l'aide d'un logiciel permettant d'évaluer le nombre d'animaux minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les paramètres à mesurer (données préliminaires obtenues dans d'autres expériences réalisées au laboratoire)

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement. Les protocoles utilisés ayant un degré de sévérité léger au maximum, les animaux ne présentent pas de signes de souffrance habituellement. Cependant, dans le cas où certains signes seraient observés, un traitement oral avec du paracétamol serait mis en place

- Remplacement : Afin de proposer une thérapie cellulaire chez l'homme, il est important de démontrer la sécurité des cellules souches mésenchymateuses humaines dans un modèle

immunodéficient pertinent. Des modèles in vitro ne peuvent pas évaluer la toxicité de ces cellules à court et moyen terme.

11960 Le vieillissement de la population et les maladies cardiovasculaires génèrent des pathologies parmi lesquelles l'insuffisance rénale, qui au stade sévère, occasionne des traitements lourds tels que la dialyse et la transplantation.

La dysfonction rénale se traduit généralement par une diminution de la fonction de filtration du rein. Environ 10 % de la population générale, présenterait une insuffisance rénale. Il est donc essentiel de pouvoir diagnostiquer efficacement cette maladie afin de prendre en charge au plus vite les patients, et ainsi, empêcher sa progression vers un stade sévère tel qu'une insuffisance rénale chronique. Les biomarqueurs utilisés actuellement pour évaluer l'avancée de la maladie sont des mesures de biomolécules dans le sang comme la créatinine, mais ces mesures sont insuffisantes car imprécises et non spécifiques du rein pathologique. Il est donc nécessaire de disposer de nouvelles méthodes de diagnostic quantitatives plus fiables de la dysfonction rénale.

Le but de ce projet est d'évaluer de nouvelles molécules d'imagerie, appelées sondes, pour le diagnostic de la dysfonction rénale par imagerie optique. Un modèle de souris saine et deux modèles de fibrose rénale chez la souris reflétant différents aspects de cette pathologie, permettront d'évaluer la capacité de nos sondes à diagnostiquer la pathologie. De plus, nous évaluerons également l'efficacité des sondes à suivre l'effet d'un traitement anti-fibrotique après administration d'un principe actif commercial couramment utilisé dans la médecine humaine pour traiter les insuffisances rénales. Ce projet nécessitera 60 souris.

L'utilisation de l'imagerie permet le suivi du même animal au cours du temps et ainsi une réduction du nombre d'animaux nécessaires pour atteindre l'objectif.

Toutes les expériences seront réalisées sous anesthésie générale afin de limiter la souffrance des animaux. Des antidouleurs seront utilisés en cas de nécessité. Des points-limites ont été établis et une grille d'évaluation de la douleur a été développée spécifiquement pour cette étude. Un score de douleur trop élevé impliquera la mise à mort de l'animal avant la fin de l'étude. Le nombre d'animaux a été limité au minimum pour obtenir des résultats avec des tests biostatistiques utilisés.

A terme, les résultats de ce projet permettront de développer une méthode de diagnostic basée sur l'imagerie ainsi qu'un traitement personnalisé contre les dysfonctions rénales, avec une perspective de transfert chez l'Homme.

11961 Le but du présent projet, proposé par 4 centres partenaires d'un réseau national de plateformes dédiées à l'expérimentation animale, est de standardiser plusieurs procédures classiques du phénotypage métabolique et cardiaque de la souris, afin que les résultats soient comparables d'un centre de recherche à un autre. Ces procédures comprennent la mesure de la dépense énergétique couplée à la surveillance de la consommation de nourriture et de boisson, l'analyse de la composition corporelle, la mesure des marqueurs métaboliques plasmatiques, un test fonctionnel de tolérance au glucose (GTT) et une échographie cardiaque non invasive. Les procédures seront réalisées sur deux souches de souris qui présentent des résultats différents dans ces procédures : la C57Bl6/J, l'un des modèles de rongeurs utilisés dans les neurosciences et le métabolisme, et les souris compétentes en mélatonine C3HeB / FeJ.

Pour les conditions de base, chaque plateforme exposera les animaux à son propre régime alimentaire standard. Les souris seront ensuite nourries avec un régime riche en graisses commun pendant 12 semaines. Les différentes procédures seront effectuées avant et après le régime. Ce projet nous permettra d'évaluer la reproductibilité entre centres et donc la robustesse de nos résultats pour le phénotypage des souris, ce qui est un pré-requis pour démarrer des projets de recherches communs sur différents sites.

RAFFINEMENT: Les procédures seront réalisées dans le respect du bien-être animal pour limiter la souffrance, la douleur ou l'angoisse des animaux. Un suivi quotidien des animaux sera assuré pour réduire tout inconfort ou douleur qui se développerait. L'inconfort sera évalué en fonction du

niveau de douleur observée (0 à 3), et s'il y a douleur, elle sera gérée en prenant les mesures appropriées.

REMPACEMENT: étant donné que les 4 centres partenaires du réseau travaillent sur le phénotypage chez la souris et que le but de cette étude est d'harmoniser les procédures sur cet animal il n'est pas possible de remplacer cette espèce. De plus l'exploration du métabolisme et des fonctions cardiaques qui impliquent de nombreux organes et mécanismes associés nécessitent un organisme entier.

REDUCTION: nous n'utiliserons que les souris mâles étant donné qu'ils répondent mieux à un régime riche en graisse et développent un syndrome métabolique net ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, nous utiliserons au maximum 64 animaux pour ce projet.

Le fait de standardiser les méthodes entre les différents centres est un élément clé permettant d'assurer la qualité des données scientifiques et de ce fait vise à réduire par la suite le nombre d'animaux utilisés en expérimentation.

11962 Cette demande d'autorisation à expérimenter sur animaux vivants porte sur l'immunisation de juments par l'injection de doses antigéniques préparées à partir de pathogènes équins ainsi que sur la réalisation de prélèvements sanguins hebdomadaires afin d'obtenir des sérums de référence pour les pathogènes testés. La démarche de ce protocole est comparable au processus classique de vaccination d'un animal par injection d'un vaccin antigénique.

Les sérums obtenus seront utilisés pour améliorer la performance et l'homogénéité des méthodes de diagnostic officielles des maladies équines réglementées au niveau français, européen et mondial ainsi qu'au développement de nouveaux outils de diagnostic innovants.

Cette demande porte sur une durée de 5 ans et couvre la possibilité de produire des sérums positifs équins pour un panel de maladies équines listées à l'OIE section 2.5.:

1. Les encéphalites virales des équidés (virus West Nile ou WNV, virus de l'encéphalite japonaise, encéphalite équine de l'Est, de l'Ouest ou du Venezuela),
2. L'anémie infectieuse des équidés (AIE),
3. L'artérite virale équine (AVE),
4. La rhinopneumonie équine (EHV-1 et 4),
5. La stomatite vésiculeuse (VSV),
6. La métrite contagieuse équine (*Taylorella equigenitalis*),
7. La morve (*Burkholderia mallei*),
8. La dourine (*Trypanosoma equiperdum*).

Des sérums positifs pourront également être produits à partir de pathogènes proches (ex : *Burkholderia pseudomallei*, *Trypanosoma evansi*...) pour améliorer le diagnostic différentiel de ces maladies.

La procédure de production de sérums de référence de pathogènes équins sur chevaux consiste à :

- i) Préparer des doses d'immunisation non infectieuses à partir de pathogènes inactivés ou de protéines spécifiques auxquels sera associé un adjuvant pour stimuler la réaction immunitaire.
- ii) Injecter une dose d'immunisation (volume approximatif de 2 ml) en intramusculaire au niveau de l'encolure des juments. En fonction de l'intensité de la réponse immunitaire, 1 à 2 injections supplémentaires pourront être effectuées. En réponse à ces injections, de possibles inflammations locales sont à prévoir.
- iii) Prélever régulièrement 5 à 20 ml de sang, pour procéder à différents suivis biologiques (réponse immunitaire, réponse cellulaire...).
- iv) Prélever toutes les une à deux semaines au maximum 500 ml de sang au niveau des veines jugulaires sur une durée maximale de 13 semaines, pour la préparation des sérums de référence.

Remplacement : A ce jour, il n'y a pas d'alternative à la production de matériaux biologiques de référence à partir de chevaux pour la réalisation des méthodes officielles pour le diagnostic sérologique des maladies équine.

Réduction : Cette demande couvre un grand nombre de maladies, toutefois, le nombre de souches à étudier est relativement limité et le nombre d'animaux impliqués dans cette demande au cours des 5 prochaines années sera inférieur à 20. L'immunisation d'un animal permettra de couvrir les besoins des laboratoires pour plusieurs années.

Raffinement : Les principales sources de stress et d'inconfort pour les animaux semblent limitées et uniquement liées : i) à l'injection, ii) aux prélèvements sanguins et iii) au risque d'inflammation locale. Un suivi régulier de l'état de santé général des juments sera effectué deux fois par jour tout au long de ce protocole. Une fiche de suivi a été mise en place, contenant une grille d'évaluation avec un système de scoring de type 0/1/2 en fonction de l'intensité des signes cliniques observés. Les critères retenus comme pertinents, sont : la température, la présence d'oedème, la douleur locale au niveau de l'oedème, le dynamisme général, l'abreuvement l'appétit, ainsi que tout autre clinique potentiellement observé. Lors d'une visite de l'animal, si le score total est supérieur à 5 ou si le score d'un critère donné est égal à 2, le vétérinaire du centre sera sollicité pour déterminer si l'animal devra être traité et/ou exclu du protocole.

Pour conclure, par la mise en place de ces protocoles d'immunisation, les réactifs produits participeront de manière durable à améliorer la performance et l'homogénéité des méthodes de diagnostic officielles des maladies équine, tout en ayant un impact limité sur la santé et le bien-être des juments, qui à l'issue du protocole seront réintégrées dans leur environnement initial.

11963 La sclérose tubéreuse de Bourneville (STB) touche une naissance sur 8000 et se manifeste par l'apparition précoce de crises épileptiques sévères résistantes aux traitements pharmacologiques. Il est crucial de trouver de nouveaux candidats pharmacologiques pour le traitement des crises chez les patients.

Dans de nombreux modèles épileptiques l'adénosine semble participer à des mécanismes antiépileptiques naturels qui bloquent la survenue des crises et limite leur durée. Nos données préliminaires montrent que le diadénosine-méthyl-tetraphosphate (AppCH₂ppA) est un candidat thérapeutique prometteur car il stimule ces processus antiépileptiques naturels et présente de puissantes propriétés inhibitrices sur la transmission synaptique et l'excitabilité neuronale intrinsèque.

Nous souhaitons tester l'AppCH₂ppA pour traiter les activités épileptiformes spontanées présentes chez un modèle murin pour la STB la souris Tsc1^{+/-}. Des travaux, réalisés par l'équipe, ont permis de montrer que ces crises, enregistrables par la technique de l'électroencéphalographie intracorticale (EEG), surviennent dans une fenêtre temporelle précoce comprise entre le 9^{ème} et le 20^{ème} jour post-natal (P9 et P20). Cette étude a également montré que les crises sont fortement comparables aux crises présentes chez les patients humains. Nous avons donc choisi d'étudier les effets de l'AppCH₂ppA sur la survenue des crises épileptiques des souris Tsc1^{+/-} autour de P15.

Afin d'éviter l'utilisation systématique de souris nous utiliserons du tissu humain issus de patients STB. Cependant les résections cérébrales chez des patients STB n'étant pas fréquentes, ce modèle ne suffira pas et l'utilisation des animaux sera indispensable.

L'utilisation d'un modèle génétique est une alternative à l'utilisation de modèle pharmacologique d'induction de crises, plus sévère pour les animaux, tel que l'induction de crises à la pilocarpine ou au Kaïnate. Le modèle que nous avons choisi est un modèle d'épilepsies spontanées qui présente un phénotype moins dommageable.

Nous avons choisi de limiter l'utilisation d'animaux vivants entiers en privilégiant au maximum la réalisation de tranches de cerveau ce qui permettra de réduire la souffrance et le stress liée à l'expérimentation.

Afin de limiter le nombre total de souris à générer, nous étendrons notre investigation à trois âges postnataux (P14, P15 et P16) ce qui permettra de limiter le nombre total de portées à générer en utilisant trois animaux par portée.

Ainsi nous limiterons l'utilisation des souris au minimum nécessaire pour répondre avec confiance aux questions suivantes :

1°) L'App est-il un candidat intéressant pour traiter les crises épileptiques dans le contexte de la STB ?

Pour répondre à cette question, des enregistrements EEG seront réalisés et les effets antiépileptiques de l'App seront testés.

6 groupes d'expériences seront réalisés et 5 souris par condition seront nécessaires pour dégager des conclusions claires. Toujours dans un souci de réduction du nombre de souris, nous limiterons notre investigation aux effets de l'AppCH2ppA sur les activités épileptiformes et ne testerons pas la drogue sur « l'activité normale » des souris sauvages.

2°) Quels sont les effets de l'AppCH2ppA sur l'activité neuronale corticale ?

Pour répondre à cette question, des enregistrements de l'activité de neurones sur tranches de cortex seront réalisés.

7 groupes d'expériences seront réalisés et 3 souris par condition seront nécessaires pour explorer les mécanismes d'action de l'AppCH2ppA sur l'activité des réseaux neuronaux ainsi que sur l'activité épileptiforme des tranches.

Nous estimons ainsi à 51 le nombre total de souris qui participeront à l'expérimentation et à 102 le nombre total de souris à générer.

Les animaux seront hébergés par groupe dans des cages adaptées au nombre d'animaux et enrichies avec des matériaux de nidification et de stimulation dans une animalerie dont les paramètres environnementaux seront contrôlés. Les animaux seront visités quotidiennement et leur état de stress, de souffrance et de douleur sera évalué. Au cours des expérimentations des anesthésiques et analgésiques seront utilisés pour limiter la souffrance et le stress des animaux si l'expérimentation le permet. Pour les expériences où l'anesthésie sera impossible, des analgésiques seront injectés si des signes de souffrances apparaissent (poil hérissé, vocalisations, posture...).

11964 Les infections bactériennes sévères représentent un problème croissant de santé publique. Le choc septique en constitue la présentation la plus grave qui demeure grevée d'une mortalité importante. Le sepsis représente ainsi une cause majeure de décès à l'hôpital, et le choc septique, sa forme la plus sévère, demeure grevée d'un taux de mortalité de 40 à 50%. Le sepsis est caractérisé par une intense réaction inflammatoire suivie d'une phase d'immunodépression soutenue. Grâce aux progrès de la réanimation, la plupart des patients survivent à la phase initiale mais présentent alors une susceptibilité particulière aux infections nosocomiales, et notamment aux pneumonies acquises en réanimation, liées à des bactéries peu virulentes mais souvent multi-résistantes aux antibiotiques. Ceci justifie un important effort de recherche, afin d'en élucider les mécanismes immunopathologiques et d'envisager des solutions thérapeutiques innovantes préventives ou curatives des infections nosocomiales.

Les pneumonies nosocomiales représentent des complications fréquentes et redoutées en réanimation, et demeurent grevées d'une importante morbi-mortalité. Les dysfonctions immunitaires induites par l'infection primaire contribuent à altérer les mécanismes de défense pulmonaire envers une seconde agression infectieuse. Alors que les patients initialement admis pour une pneumonie présentent une susceptibilité particulière à l'infection pulmonaire secondaire, peu de travaux se sont consacrés à investiguer la notion de spécificité tissulaire (aussi appelée compartimentalisation) de la réponse inflammatoire et immunitaire dans ce contexte, ainsi que leurs conséquences éventuelles en termes de défense pulmonaire.

Les conséquences immunologiques induites par le choc septique sont complexes, et ne peuvent être que très insuffisamment explorées à partir de prélèvements sanguins réalisés chez l'homme,

ce qui nécessite d'avoir recours à des modèles animaux. Afin d'évaluer le rôle de la source du sepsis initial sur la susceptibilité à une infection pulmonaire secondaire, nous souhaitons établir deux modèles murins pertinents de double agression infectieuse séquentielle qui diffèrent par l'infection initiale. Les souris seront ainsi soumises soit à une péritonite polymicrobienne soit à une infection pulmonaire par inoculation intra-trachéale de pneumocoque, principale bactérie responsable de pneumonies communautaires. Les souris survivantes à cette première agression seront alors soumises à une pneumonie secondaire par inoculation intra-trachéale de la bactérie à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa*. Ces modèles miment ainsi des situations cliniques communément rencontrées chez les patients admis en réanimation pour un choc septique. Nous utiliserons différentes lignées de souris wild-type et génétiquement modifiées pour étudier les mécanismes impliqués dans la modulation des réponses immunes au cours du sepsis. Le nombre de souris utilisées sera de 1400 sur une période de 5 ans.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit à son minimum. Cela nécessite de contrôler au mieux la variabilité inhérente à ce type d'expérimentation en homogénéisant strictement les conditions expérimentales. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures expérimentales se feront sous anesthésie générale. Les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale et un traitement antalgique sera systématiquement administré aux animaux au décours de la procédure chirurgicale. Les instillations intra-trachéales seront réalisées sous une brève anesthésie générale. Nous avons raffiné la méthodologie par l'introduction de points-limites qui ont été validés avec la structure locale chargée du bien-être animal, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans la réponse aux infections graves. Cette étape expérimentale est un préalable indispensable à une meilleure compréhension de la réponse immunitaire de l'hôte et à l'identification de nouveaux marqueurs biologiques et de nouvelles cibles thérapeutiques.

11965 Le pancréas est actuellement le quatrième site de mortalité par cancer dans l'UE pour les deux sexes, ayant récemment dépassé les taux de cancer de l'estomac chez les deux sexes et les taux de cancer de l'utérus chez les femmes. Le cancer du pancréas présente également des taux de mortalité défavorables et son incidence est en très forte augmentation depuis 1980. Le cancer du pancréas est une tumeur de très mauvais pronostic. Lorsque le diagnostic de cancer de pancréas est porté, la survie à 5 ans est inférieure à 5 %.

Les chimiothérapies conventionnelles exploitent les propriétés cytotoxiques d'agents anticancéreux non sélectifs. Ils agissent principalement sur les cellules tumorales mais parfois sur les cellules saines, provoquant des effets secondaires responsables de l'arrêt des traitements chez les patients. Depuis quelques années, des stratégies de chimiothérapies ciblées ont émergé afin de véhiculer un agent anticancéreux vers son site d'action sous la forme d'un médicament non-toxique, puis de régénérer son activité toxique exclusivement au niveau de la tumeur.

Au cours de ce projet, nous désirons évaluer l'efficacité antitumorale d'une nouvelle prodrogue, sur un modèle de souris porteuses de tumeurs pancréatiques.

Le suivi de la croissance tumorale sera réalisé par un procédé d'imagerie non invasive et devrait permettre d'évaluer l'efficacité de cette approche thérapeutique en temps réel tout en limitant la souffrance des animaux.

A terme, ce projet a pour objectif de valider l'efficacité d'un nouveau traitement permettant le ciblage et la délivrance in situ de molécules vectorisées très efficaces contre les cellules tumorales, véhiculant un agent chimiothérapeutique très toxique (ne pouvant être administré tel quel dans le cadre d'une chimiothérapie conventionnelle). Ces essais sont nécessaires avant d'envisager un éventuel transfert vers l'Homme.

Cette étude ne peut être réalisée que chez l'animal puisque les tests in vitro ne peuvent tenir compte de l'aspect physiologique du processus de développement tumoral. Cette étude qui se déroulera sur 4 mois nécessitera l'utilisation de 100 souris.

Ce projet sera mené conformément à la règle des 3R : examens d'imagerie non invasive sur animaux anesthésiés, qui ne susciteront pas de stress important à l'animal (raffiner). Le nombre d'animaux sera réduit au minimum grâce au suivi longitudinal par imagerie ; 100 souris maximum qui seront utilisés (réduire). Le développement de modèles animaux reste nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de modèles représentatifs de la complexité d'un organisme entier ni de cette pathologie (remplacer).

11966 Le sepsis humain est caractérisé par un ensemble de réactions systémiques en réponse à l'infection intensive et massive qui a échoué à être contenue localement par l'hôte. Actuellement, la septicémie se classe parmi les dix premières causes de mortalité dans les unités de soins intensifs. Au cours du sepsis, il y a deux phases qui peuvent se chevaucher. La phase initiale est définie comme une production massive de cytokines pro-inflammatoires et est la cause la plus fréquente de mortalité. La deuxième phase est un procédé anti-inflammatoire connu comme immunosuppressive, augmentant fortement le risque d'infections nosocomiales et finalement, la mort. Les deux phases de la septicémie peuvent causer des dommages irréversibles et irréparables.

Le modèle clinique le plus largement utilisé est la ligature caecale et perforation (CLP) permettant la libération de matières fécales dans la cavité péritonéale pour générer une réponse immunitaire exacerbée induite par une infection polymicrobienne. Ce modèle permet d'induire un sepsis de gravité approprié, contrôlé et générant des résultats constants et reproductibles, proche de ceux observés chez l'homme.

La phase préclinique qui consiste à l'étude de l'action des agents pharmacologiques in vivo chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments antibiotiques et/ou anti-inflammatoires. Les animaux vont être anesthésiés et une partie de leur caecum va être ligaturé et perforé avec une aiguille de taille proportionnelle à la maladie souhaitée. Les animaux seront ensuite mis à mort au bout de 1 ou 6 jours afin d'analyser différents paramètres immunologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité des molécules testées sur le développement de la maladie.

Différents dommages vont affecter l'animal notamment des dommages pulmonaires et cardiovasculaires.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 sauvage. La ligature et la perforation du caecum se fait sous anesthésie générale afin de minimiser les situations douloureuses et stressantes. Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation va dépendre des résultats obtenus et du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 10 études, incluant au maximum 180 animaux, soit 1800 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et les points limites sont définis afin d'éviter au maximum la douleur et le stress au moment de l'expérimentation.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

11967 *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène important pour l'homme récemment classé comme pathogène dit critique par l'organisation mondiale de la santé. Il s'agit d'un pathogène opportuniste touchant principalement les personnes immunodéprimées, parmi lesquelles les patients atteints de mucoviscidose. Un vaccin innovant anti-*Pseudomonas aeruginosa* a été développé. L'objectif est d'étudier l'impact de la modulation de la flore intestinale par la prise d'un prébiotique sur la réponse vaccinale. Ces travaux nécessiteront au total 96 souris. Nous respectons la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). On ne peut se passer du modèle animal car nous souhaitons évaluer la réponse immune systémique induite par le vaccin en présence ou non du prébiotique par voie orale. En revanche, nous avons optimisé les groupes de manière à obtenir une réponse fiable d'un point de vue statistique et un maximum d'information sur l'immunité (prélèvement multiple). De plus, un groupe de souris sera épargné puisque nous allons utiliser la flore d'animaux nourris au prébiotique d'un précédent projet dans le transfert de flore. Afin d'assurer le bien-être des animaux, les souris seront hébergées en groupe avec un environnement enrichi. Les prébiotiques seront administrés via l'eau de boisson. La vaccination et les prélèvements sanguins seront pratiqués sous légère anesthésie générale en respectant les bonnes pratiques vétérinaires. Enfin, les animaux seront quotidiennement surveillés, pesés au moins 2 fois par semaine et sortis du protocole s'ils présentent des signes de souffrance supérieurs aux points-limites fixés.

11968 Ce projet de recherche concerne le développement de stratégies thérapeutiques innovantes non-invasives applicables à des pathologies d'origine traumatique dont aucun traitement à ce jour n'est disponible. Les lésions de la moelle épinière au niveau cervical sont relativement fréquentes chez l'homme, entraînant des problèmes au niveau locomoteur ainsi qu'au niveau du contrôle neural de l'activité respiratoire et cardio-vasculaire, représentant ainsi la première cause de mortalité chez les patients. Une restauration partielle spontanée de l'activité respiratoire, cardiovasculaire ainsi que locomotrice peut être observée après lésion incomplète au niveau cervical, principalement due à une réorganisation des projections synaptiques épargnées. Cette restauration fonctionnelle est relativement faible, il devient nécessaire de développer des stratégies thérapeutiques innovantes en vue d'améliorer les activités motrices perdues chez les patients et d'éliminer l'assistance mécanique ventilatoire. Plus particulièrement, nous nous focalisons sur le développement et l'étude de traitements visant à améliorer la fonction respiratoire et cardiovasculaire après traumatisme de la moelle épinière en cervical.

Nous utilisons un modèle in vivo de lésion spinale cervicale chez le rat. Ce modèle est reproductible et limite le nombre d'individus requis pour obtenir des résultats statistiquement probants.

Les techniques que nous développons sur ce modèle sont de deux ordres :

- Une approche pharmacologique pour modifier le métabolisme énergétique et induire des réponses moléculaires bénéfiques pour la restauration des fonctions atteintes et
- la neuromodulation non-invasive par rTMS (stimulation magnétique transcrânienne) des neurones du cerveau et de la moelle épinière en vue d'améliorer le contrôle neuronal des fonctions ventilatoires et cardiovasculaires.

Afin de limiter le nombre d'individus, et dans le strict respect de la règle des 3R, nous utilisons des outils de diagnostic non-invasifs et non restreints, comme la pléthysmographie et l'échocardiographie doppler, afin d'avoir un suivi du même individu au cours du temps. Un suivi quotidien des animaux ainsi qu'un contrôle de la douleur sera pris en compte en utilisant des antidouleurs en chronique. De plus, nous incluons nos animaux dans différentes procédures expérimentales légères afin de réduire le nombre d'animaux en évitant l'utilisation de divers groupes distincts lors des études temporelles. Un nombre total de 1150 animaux sur les 5 années du projet sont nécessaires à sa réalisation. Une connaissance de l'application de ces divers traitements ainsi que de l'efficacité de ceux-ci permettront une meilleure compréhension de leur efficacité, et pourraient aboutir à l'élaboration d'un traitement pour les patients souffrant de traumatismes spinaux. À l'heure actuelle, il n'y a pas de modèle expérimental clinique autre que les sujets humains ou animaux pour étudier les réponses physiologiques intégrées. Nous ne serions pas en mesure d'effectuer les manipulations nécessaires (par exemple, une intervention pharmacologique dans les systèmes de neurotransmetteurs, des tests neurochimiques) chez l'homme, et nous devons donc

recourir à l'expérimentation sur les espèces de mammifères non humains. Les connectivités neuronales de ces systèmes intégrés nécessaires pour mener "des études de modélisation" ne sont pas disponibles et il n'existe actuellement aucun substitut à l'expérimentation animale. Les concepts qui ont guidé cette recherche sont nouveaux dans le domaine et, à ce titre, doivent être soigneusement étudiés dans des situations biologiquement significatives.

11969 La prise en compte des effets sur la santé des polluants environnementaux est un défi majeur en termes de santé publique et une préoccupation notable du grand public. Les effets des polluants de type perturbateurs endocriniens (PE) – présents par exemple dans des engrais, plastiques, pesticides – sont particulièrement surveillés. Alors que leur présence dans l'environnement a augmenté au cours des dernières décennies, une hausse significative de pathologies de la reproduction masculine a été rapportée durant la même période. Des études épidémiologiques européennes, américaines et asiatiques suggèrent un lien de causalité entre ces deux phénomènes. Parmi ces pathologies, le cancer testiculaire et, plus spécifiquement, le carcinome in situ, est le cancer le plus fréquemment rencontré chez l'homme jeune. L'origine de ce cancer serait imputable à un défaut de différenciation des cellules germinales fœtales ou pré-pubères qui seraient exposées, pendant la vie fœtale et périnatale, aux polluants environnementaux de type PE.

Ce projet sur 5 ans vise à :

- mettre en évidence si une exposition chronique des cellules germinales fœtales aux PE peut conduire à long terme à la formation de carcinome in situ,
- caractériser les mécanismes génétiques et épigénétiques mis en jeu.

Ainsi ce projet se divise en trois parties : 1- Caractérisation de l'impact d'une exposition chronique aux PE sur la différenciation des cellules germinales (CG) fœtales.

2- Corrélation entre les défauts de différenciation germinale observés et des altérations transcriptionnelles et épigénétiques induites par l'exposition aux PE.

3- Evaluation à long terme du développement de carcinome in situ après exposition aux PE.

Afin de se replacer dans un contexte classique d'exposition environnementale, des testicules fœtaux humains de 8 à 10 semaines de gestation seront exposés à un mélange de PE couramment rencontrés : le DiEthylHexylPhtalates (DEHP) et le bisphénol A (BPA), sur une durée de 8 à 10 semaines. Pour maintenir la survie et la différenciation des cellules germinales sur cette durée et pour recréer le modèle d'exposition classique par ingestion, nous grefferons les testicules fœtaux humains chez des souris immunodéficientes et exposerons les souris aux pesticides par leur eau de boisson (mélange de PE à des concentrations environnementales).

A la fin de l'exposition, les greffons seront collectés et analysés par histologie/immunohistologie afin d'identifier, après exposition, des altérations du nombre, de la prolifération et de la différenciation des cellules germinales. Dans un second temps, si des altérations germinales sont observées, nous collecterons les cellules germinales en fin d'exposition et nous rechercherons, par séquençage ARN et MedipSequencing, les molécules cibles des PE qui peuvent être altérées et qui conduisent à ces défauts. Enfin, il sera nécessaire d'évaluer le potentiel tumorigénique des cellules germinales fœtales dont la différenciation a été altérée par l'exposition au PE. Le processus de carcinogenèse germinale est un processus long et qui ne se déclare qu'à la puberté au moment où les cellules germinales commencent à rentrer en spermatogenèse. Ainsi, afin de recréer un contexte somatique testiculaire pubère, nous transplanterons les cellules germinales fœtales humaines exposées aux PE dans un testicule de souris pubères immunodéficientes. Après deux mois de stabulation, les testicules seront collectés et la survenue de carcinome in situ sera évaluée par immunohistologie.

Dans cette étude, l'utilisation de la souris n'est pas substituable par d'autres méthodes (in vitro, in silico). Seul le modèle de xénogreffe de testicules fœtaux humains autorise la survie et le développement corrects des cellules germinales sur du moyen-long terme (plus de 8-10 semaines), temps et modèles nécessaires pour reproduire fidèlement l'exposition environnementale à laquelle la femme enceinte est exposée. De la même manière, il n'est pas possible de recréer in vitro le contexte somatique testiculaire adulte pour permettre la survie et la différenciation des cellules

germinales humaines et seul le modèle de transplantation de cellules humaines dans des testicules murins l'autorise.

Pour ce projet, 150 animaux sont prévus, soit 30 animaux par an. Le nombre d'animaux prévu pour ce projet a été réduit au maximum tout en conservant un effectif suffisant pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'établissements agréés et sont hébergés dans les conditions d'élevage propices au bien-être animal. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux, dont l'état de santé sera surveillé quotidiennement tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de stress ou de souffrance. Les expériences seront faites sous anesthésie avec administration d'analgésie afin de prendre en charge les douleurs éventuelles. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus qui compromettraient le bien-être d'un animal. Ce projet est prévu sur une durée maximale de 5 ans ; au cours de cette période les expériences seront menées successivement et tout protocole induisant un stress ou une souffrance inattendue lors des premières expérimentations sera évidemment arrêté.

11970 L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (chaperone-mediated autophagy ou CMA) – encore largement méconnue- est l'une des voies majeures de l'autophagie qui se caractérise par la dégradation de protéines portant dans leurs séquences un motif protéique particulier. Cette reconnaissance des protéines et leur dégradation se fait au niveau des lysosomes qui sont des organites cellulaires présents dans le cytoplasme cellulaire.

Cependant, de récentes études ont démontré qu'elle était induite lors de stress (notamment nutritif et oxydatif) et qu'un dérèglement de cette fonction cellulaire entraîne des perturbations importantes du métabolisme intermédiaire (révélant un pan totalement ignoré du contrôle métabolique) et serait à l'origine de certaines maladies neurodégénératives et de cancers.

Selon l'idée actuellement admise, la CMA n'existerait que chez les mammifères ou les oiseaux, qui seraient les seuls à exprimer la protéine LAMP2A, indispensable au fonctionnement de cette fonction cellulaire. Or, en tirant profit de la base de données transcriptomiques Phylofish (dédiée à une vingtaine d'espèces de poissons), nous avons pu mettre en évidence l'existence de cette protéine chez un certain nombre d'espèces de poissons dont le medaka (*Oryzias latipes*).

Dans ce contexte, notre projet a pour objectif de mettre à jeun (au maximum 30 jours) des medaka adultes afin d'induire ce processus biologique. Cela permettra de déterminer précisément le rôle physiologique de cette protéine chez cette espèce. Cela pourrait ainsi ouvrir ce domaine de recherche à d'autres espèces et faire progresser notre connaissance du rôle de la CMA encore peu connu. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet est de 124 poissons mis à jeun (61 poissons wild type et 61 poissons transgéniques pour le gène *lamp2a*) et 124 poissons ne subissant pas de stress nutritif (61 poissons wild type et 61 poissons transgéniques pour le gène *lamp2a*)

Ce projet bien que mettant en place une période de jeun sur les medaka, se conforme entièrement à la règle des "3R" :

-Remplacer : L'alternative in vitro ne saurait remplacer les modifications physiologiques induites dans l'ensemble de l'organisme d'un animal vivant. En outre, les poissons générés constitueront un modèle d'étude pertinent pour une meilleure compréhension globale des perturbations métaboliques liées à la perte du CMA à l'échelle d'un organisme.

-Réduire : Le nombre d'animaux est adapté afin de mettre en place l'ensemble des manipulations nécessaires à la description de ce processus biologique chez le poisson. Ce nombre correspond également au nombre minimum nécessaire pour effectuer les analyses statistiques adéquates.

-Raffiner : Afin de réduire autant que possible la souffrance et le stress des animaux et améliorer le bien-être, plusieurs mesures seront prises allant de la mise en place de conditions d'élevages adaptées, à l'emploi d'une procédure d'euthanasie agréée par le comité éthique.

En outre, nous serons attentifs aux effets engendrés par la période de jeun sur les animaux et procéderons à l'euthanasie des poissons avant l'apparition de troubles graves.

11971 Le purpura thrombopénique idiopathique (PTI), forme de purpura thrombopénique immunologique, est dû à une destruction périphérique des plaquettes. Les plaquettes participent au maintien de l'intégrité vasculaire et à une coagulation normale. Une thrombopénie excessive se manifeste par un syndrome hémorragique appelé purpura cutanéomuqueux. La prise en charge du PTI a pour objectif de réduire ou supprimer le syndrome hémorragique.

Cependant l'efficacité des traitements utilisés est transitoire, et aucun traitement ne permet à l'heure actuelle de supprimer la maladie. C'est pourquoi la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

La phase préclinique qui consiste à l'étude de l'action des agents pharmacologiques in vivo chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments à visée anti inflammatoire. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments permettant d'inhiber l'évolution du PTI. Les animaux vont recevoir par voie intraveineuse ou intra-péritonéale une quantité définie d'anti-CD41 (1 à 5 µg/souris), un anticorps qui induit la suppression des plaquettes et qui permet de mimer un PTI. Les animaux vont recevoir différents traitements avant ou après induction de la maladie et leur sang sera prélevé à différents temps pour analyser différents paramètres immunologiques et hématologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité des molécules testées sur le développement de la maladie (signes cliniques) et sur l'évolution du taux de plaquettes.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/C. L'administration de l'anti-CD41 à l'animal se fait par voie intraveineuse ou intra-péritonéale. Ce modèle n'induit pas de douleur à l'animal, puisque la thrombopénie n'est pas un phénomène douloureux.

Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles qui sont requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études. Une étude comportera jusqu'à 90 animaux. Le nombre total de souris prévu pour ce projet est de 1800 animaux.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant le purpura thrombopénique idiopathique. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. Des points limites sont mis en place et appliqués afin de limiter la souffrance de l'animal et les prélèvements de sang sont effectués au niveau retro-orbital sous anesthésie gazeuse (Isoflurane®) afin de minimiser le stress de l'animal et la douleur liée au prélèvement.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

11972 Le projet a pour but d'étudier, sur 5 ans maximum, le rôle des plaquettes dans le développement de la fibrose pulmonaire. La durée s'explique par un temps de reproduction plus long chez certaines lignées de souris génétiquement modifiées.

La fibrose pulmonaire est caractérisée par un excès de tissu cicatriciel dans le tissu pulmonaire, ainsi les poumons ne parviennent plus à assurer correctement la respiration. La fibrose est issue d'un processus de cicatrisation anormale suite à des agressions répétées du tissu. Cette

cicatrisation excessive se traduit par une réparation aberrante caractérisée par un dépôt excessif de matrice extracellulaire (MEC) détruisant la structure physiologique du tissu. Par conséquent, dans le cadre de la fibrose pulmonaire, les alvéoles se dilatent moins et réduisent leurs capacités d'échanges gazeux, diminuant la capacité respiratoire des personnes malades qui souffrent alors de dyspnée.

Les traitements de la fibrose pulmonaire consistaient originellement à utiliser des composés anti-inflammatoires ou des immunosuppresseurs, mais sans donner de résultats significatifs. La fibrose pulmonaire est donc toujours une maladie mortelle et la transplantation pulmonaire reste le seul traitement efficace permettant de prolonger l'espérance de vie des patients mais aussi d'améliorer leur qualité de vie.

Il a été montré, dans le sang de patient atteint de fibrose pulmonaire idiopathique, que les plaquettes sont davantage sensibles à un stimulus. Les plaquettes sont connues pour leur rôle essentiel dans l'arrêt des saignements mais outre cette fonction primordiale vis à vis des saignements et la formation du "clou plaquettaire", ces dernières ont des effets multiples en raison de leur implication dans des processus physiopathologiques différents, comme l'inflammation ou encore la réaction immunitaire innée. La contribution des plaquettes aux réactions inflammatoires est particulièrement importante en raison de leur capacité à relarguer des molécules pro-inflammatoires on encore grâce à leur capacité d'interaction avec les leucocytes et les cellules endothéliales.

Aujourd'hui il n'existe pas d'alternative à l'utilisation de souris pour modéliser le développement de la fibrose pulmonaire, du fait de la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu. Le projet met en jeu des approches intégrées sur la souris et des explorations fonctionnelles sur animal vigile qui ne peuvent pas être substituées par des approches in vitro.

Pour cette étude, nous aurons ainsi besoin d'utiliser 420 souris au total. Ce nombre est expliqué par le fait que nous utiliserons des souris avec des génotypes différents et prenons en compte la mortalité possible due à la bléomycine. Nous rendrons également thrombopénique des souris C57BL6 par injection rétro-orbitale d'un anticorps permettant l'élimination des plaquettes. De plus, on utilisera des agents anti-plaquettaires (ex : aspirine) chez des souris C57BL6. On utilisera 20 souris par génotype instillées à la bléomycine (produit permettant le développement de la fibrose) et 10 souris par génotype instillées avec du sérum physiologique, servant de contrôles. Les phénotypes ne sont pas dommageables concernant ce projet.

Les souris seront anesthésiées, une incision sera réalisée au niveau de la trachée afin d'instiller la bléomycine (ou le sérum physiologique) à l'intérieur de la trachée afin que le produit atteigne les alvéoles. Enfin deux points de suture seront réalisés et un analgésique sera utilisé au réveil de la souris. Chaque procédure durera 14 jours maximum. A la fin de la procédure, les souris sont sacrifiées par surdosage d'isoflurane et dislocation cervicale, un lavage broncho-alvéolaire est effectué et enfin les poumons sont récupérés pour différents dosages et analyses histologiques.

Nous utiliserons des souris de 8 à 12 semaines. De plus, pour répondre à des questions de biologie cellulaire et moléculaire nous utiliserons des cultures primaires ce qui réduit significativement le nombre d'animaux inclus dans cette étude. Néanmoins, la partie in vitro en culture cellulaire ne nous permet pas de répondre totalement à notre problématique. En effet, la physiopathologie de la fibrose pulmonaire est complexe et nécessite un environnement cellulaire spécifique que l'on ne peut retrouver que dans un modèle murin.

Toutes les expériences seront faites dans le respect de la règle des 3R et toute souffrance animale sera prise en charge avec l'utilisation d'analgésiques et des points limites bien définis. En effet, une évaluation quotidienne par grille de score sera utilisée.

Cette grille renseignera sur l'apparence de la souris. Une perte de poids supérieure à 20% (par rapport au poids pré-opératoire) sera considérée comme un point limite. Toutes les souris en post-opératoire recevront une injection d'analgésique. Chaque paramètre observé donnera lieu à une note.

Au final, ces résultats permettront pour la première fois de comprendre le rôle des plaquettes dans le remodelage tissulaire de la fibrose pulmonaire et peut-être permettre le développement d'agents thérapeutiques ciblant les plaquettes.

11973 Les cancers cervicaux sont le second type de cancers qui touchent les femmes dans le monde et sont intrinsèquement liés à l'infection par des papillomavirus (HPV). Des vaccins préventifs contre l'infection par HPV sont actuellement proposés aux jeunes filles. Ces vaccins sont efficaces mais les cancers liés à l'infection par HPV demeurent un problème majeur de santé public en raison d'une couverture vaccinale insuffisante et du fait que les vaccins n'ont pas d'effet protecteur chez les personnes déjà infectées par les HPV. Ces données soulignent l'importance de développer un vaccin anti-tumoral (vaccin thérapeutique) capable d'enrayer la croissance des tumeurs liées aux HPV. Dans ce contexte, notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à l'utilisation d'un virus, l'adénovirus, comme outil de vaccination. Il est possible de réduire sa toxicité, de contrôler sa dissémination et de le modifier à des fins vaccinales. Ainsi, nous avons montré que des animaux vaccinés par des adénovirus portant à leur surface des fragments de protéines étaient capables de générer des réponses immunitaires dirigées contre ces protéines. En se basant sur ces résultats, nous avons greffé à la surface des adénovirus des fragments de protéines d'HPV exprimées dans les cancers cervicaux. Notre projet a pour but d'examiner si cette stratégie d'exposition de fragments protéiques à la surface des adénovirus pourrait être utilisée pour développer des vaccins thérapeutiques anti-HPV. Pour analyser la capacité de ces vecteurs adénoviraux à induire des réponses immunitaires, l'utilisation de modèles murins est nécessaire. En effet, il reste impossible à ce jour de reproduire par des techniques *in vitro* les interactions de différentes cellules nécessaires à l'établissement et à la maturation des réponses immunitaires.

Notre projet se divise en 2 parties. Dans une première partie, différents vecteurs adénoviraux seront injectés chez la souris et nous quantifierons les réponses immunitaires anti-HPV. En particulier, nous évaluerons l'influence de différents paramètres sur l'efficacité vaccinale (dose de vecteurs, mode d'administration, état immun ou non vis-à-vis de l'adénovirus, génotype des souris). Dans une seconde partie, nous analyserons la capacité des réponses immunitaires anti-HPV à protéger les souris contre le développement de tumeurs (prévention) ou à réduire la croissance de tumeurs (thérapie).

Dans toutes les expériences, nous chercherons à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu de la littérature et de notre expérience d'utilisation des vecteurs adénoviraux, nous estimons que nous pourrions réduire le nombre d'animaux à 6 par groupe expérimental pour les expériences de suivi des réponses immunitaires et à 10 animaux par groupe expérimental pour les expériences d'analyse des effets des réponses immunitaires sur la croissance de tumeurs. Le nombre d'animaux par groupe expérimental nous permettra d'évaluer la significativité des résultats obtenus (test ANOVA suivi d'un test de Tukey). Afin de raffiner les expériences et de limiter la douleur des animaux, les souris recevront une anesthésie gazeuse (isoflurane) lors des prélèvements de sang. Certaines procédures comportent aussi des greffes de tumeur qui seront faites sous anesthésie, mesurées tous les 2 jours et arrêtées avant que la tumeur atteigne 15 mm³. Ainsi, en respectant la règle des 3R, nous estimons que le nombre de souris requises pour mener à bien ce projet au cours des prochaines années et générer des résultats significatifs sur un plan statistique sera, compte-tenu des différents vecteurs adénoviraux testés et des paramètres étudiés, d'un maximum de 1092 souris.

L'ensemble des résultats obtenus devrait nous permettre d'identifier les vecteurs les plus prometteurs pour le développement d'un vaccin thérapeutique contre les tumeurs induites par les HPV.

11974 Le paludisme affecte 500 millions de personnes et ses 2 complications majeures, l'anémie et la malaria cérébrale causent plus de 2 millions de morts par an. Il n'existe pas de traitement de la malaria cérébrale, qui touche en particulier le jeune enfant. Nous étudions l'infection à *Plasmodium berghei* Anka, un modèle reconnu d'étude du neuropaludisme chez la souris, ainsi que chez d'autres souches telles que *Plasmodium berghei* NK65 et *Plasmodium yoelii* 17XNL qui causent une malaria mais non cérébrale permettant d'étudier les réponses immunitaires de l'hôte à l'infection. Mieux comprendre le rôle du système immunitaire dans les mécanismes de défense et la pathogenèse permettra de proposer de nouvelles cibles d'intervention thérapeutiques pour mieux contrôler l'attaque cérébrale de la malaria.

L'objectif du projet est d'étudier le rôle des acteurs de la réponse de l'hôte, dont les cytokines et les voies de signalisation impliquées. Pour comprendre l'importance de ces protéines, nous étudierons le déroulement de la maladie chez des souris déficientes pour les gènes correspondants. Les modèles murins de neuropaludisme sont en effet des outils précieux pour tester les nouvelles stratégies thérapeutiques en phase préclinique, qui ne sont pas réalisables chez l'homme. Ce projet s'inscrit dans la continuité du projet CLE CCO 2012-50 qui a permis d'identifier l'importance des Interférons de type I et de l'Interleukine 33 dans la pathogenèse de la malaria cérébrale, travaux qui ont été publiés. La malaria cérébrale lorsqu'elle n'est pas fatale s'accompagne de séquelles invalidantes, notamment déficits cognitifs et neurologiques. Nous voulons maintenant caractériser ces aspects dans le modèle murin. Nous caractérisons maintenant les sources d'IL-33 et l'inflammation cérébrale retrouvée lors du développement de la pathologie, avec ses conséquences neurologiques. Une meilleure compréhension de ces signaux permettrait une approche thérapeutique plus ciblée. Contrairement aux animaux sauvages, sensibles au développement de la maladie conduisant aux décès par hémorragie cérébrale, les animaux invalidés pour un gène essentiel au développement de la malaria cérébrale sont protégés.

L'étude in vivo est indispensable pour ce projet puisque cette pathologie fait intervenir plusieurs niveaux d'interactions entre système immunitaire, barrière hémato-encéphalique et cerveau notamment, qui ne peuvent être reproduits in vitro ou in silico.

Le modèle murin permet d'étudier les défauts neurologiques et cognitifs associés à la malaria cérébrale, afin d'identifier à quels moments ils apparaissent et s'il est possible d'intervenir en amont pour les atténuer.

Ce projet contient deux procédures :

Une première comprenant l'infection de souris transgéniques afin de mieux comprendre le déroulement de la pathologie et les mécanismes de résistance in vivo. Des groupes de 5 animaux par condition et point d'observation seront utilisés de façon à limiter le nombre de répétitions de chaque procédure expérimentale tout en ayant un nombre suffisant d'individus pour valider statistiquement les résultats obtenus.

Il est prévu de faire 8 expériences par an, typiquement comprenant chacune 1 groupe contrôle et 3 groupes tests, à 2 temps d'analyse, soit 40 souris par expérience, 320 souris par an et 1600 souris au total sur 5 ans.

La seconde, consiste à des micro-injections cérébrales de molécules d'intérêt afin de préciser leur rôle local dans le développement de la neuropathologie. Des groupes de 12 animaux, nécessaires à une approche comportementale statistique, seront utilisés à la suite de la procédure de micro-injection.

Il est prévu de faire 15 études sur 5 ans, comprenant typiquement chacune 1 groupe contrôle et 5 groupes tests, soit 60 souris par expérience, soit 900 souris au total.

Chaque procédure sera suivie quotidiennement pour s'assurer du bien-être des animaux. Si des animaux montrent des signes de souffrance et/ou point limite établis atteints (perte de poids supérieure ou égale à 20%...), ils seront mis à mort.

11975 L'arthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire aigüe affectant 1% de la population. C'est une maladie dite auto-immune : des anticorps appelés « auto-anticorps » s'attaquent aux articulations qui gonflent, deviennent douloureuses et vont se déformer réduisant ainsi leur amplitude de mouvement. De nombreux traitements existent pour combattre les crises ou la maladie de fond, mais ces traitements sont très chers et induisent de nombreux effets indésirables au long terme.

La phase préclinique qui consiste à étudier l'action des agents pharmacologiques in vivo chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments à visée anti-inflammatoire. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments anti-inflammatoire. L'arthrite rhumatoïde est induite chez l'animal de deux manières :

-par injection intraveineuse de sérum de souris K/BxN, riche en auto-anticorps. Ces souris K/BxN développent spontanément une arthrite à l'âge de 3-5 semaines.

-par injection intradermique d'une solution de collagène et de M. tuberculosis tuées. Les animaux vont ainsi développer des anticorps contre le collagène et développer la maladie.

Les animaux seront ensuite mis à mort 10 jours ou 36 jours après l'injection selon le modèle utilisé pour analyser différents paramètres immunologiques et histologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité in vivo des molécules testées sur le développement de la maladie (signes cliniques) et de l'inflammation.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6. L'administration de sérum ou de collagène à l'animal se fait sur animal vigile. Ce modèle induit des douleurs inflammatoires aiguës à l'animal, liées au développement de la maladie au niveau des articulations.

Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est effectuée pendant la période d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles qui sont requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études, incluant au maximum 90 animaux, soit 1800 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant l'arthrite rhumatoïde. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

-Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

-Raffinement : Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien être et d'éviter au maximum leur douleur au moment de l'expérimentation. Des points limites sont mis en place et appliqués afin de limiter la souffrance de l'animal. (cf tableaux points limites 3.4.13)

-Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

11976 Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires. Les traitements conventionnels de nombreux cancers tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ont démontrés des limites d'efficacité nécessitant un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La perspective de ce projet est d'évaluer l'activité, dans des modèles murins de tumeurs implantées en sous-cutanées, des candidats-médicaments développés et préalablement sélectionnés pour leur activité anti-tumorale sur des modèles alternatifs.

Le projet se propose donc de valider chez l'animal l'activité thérapeutique anti-tumorale de candidats-médicaments en association ou non avec des substances connues pour leur activité anti-tumorale, et de mesurer l'intérêt que pourrait apporter ces candidats-médicaments pour le traitement des cancers en clinique humaine.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons la souris qui est un modèle de référence en oncologie, avec de multiples modèles expérimentaux disponibles. A ce jour, aucun modèle alternatif n'est suffisamment intégré et complexe pour reproduire l'ensemble des phénomènes biologiques impliqués dans les mécanismes de dégradation, de transport et d'élimination des composés pouvant affecter l'activité et/ou interférer avec les candidats médicaments. L'emploi de modèles animaux reste incontournable.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance de l'animal. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux

pendant toute la durée des expérimentations avec un enrichissement de leur milieu de vie, qui leur permet d'assouvir les comportements liés à leur espèce et de préserver les interactions sociales entre congénères. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état général des animaux. La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments pour visualiser tous signes de toxicité imprévue qui seraient suivi de l'arrêt de la procédure et de la mise à mort de l'animal.

Réduire

Seuls les composés sélectionnés sur un ensemble de modèles alternatifs, dont l'activité biologique et l'innocuité a été prouvées sur les modèles cellulaires et possédant les caractéristiques physicochimiques adaptées pour être des « candidats-médicaments » seront évalué chez l'animal. La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Il est prévu d'évaluer l'activité de 5 candidats-médicaments par an sur une période de 5 ans, soit un maximum de 2400 souris.

11977 Contexte : Les plaquettes sanguines jouent un rôle fondamental dans les processus d'hémostase. C'est ce qui nous permet d'éviter les hémorragies en cas de blessures ou de lésions. Quand le taux de plaquettes circulantes chute en dessous de 30.000 plaquettes par μL de sang chez un patient, le risque d'hémorragie interne devient important et une transfusion peut être envisagée. Une complication post transfusionnelle connue est la production d'anticorps anti-plaquettes par le receveur dirigés contre les plaquettes du donneur, on parle alors d'allo-immunisation. Ainsi, si le receveur développe de tels anticorps de nouvelles transfusions seront inefficaces sur un plan thérapeutique puisque les plaquettes du donneur seront détruites par ces anticorps. Cette problématique est particulièrement importante chez des patients dont les pathologies nécessitent des transfusions plaquettaires récurrentes.

Objectif : Définir les mécanismes qui conduisent à la production d'anticorps anti-plaquettes permettrait d'agir en amont de la transfusion et d'éviter la production de tels anticorps. Des études préliminaires au laboratoire ont permis de suggérer l'implication d'une certaine sous population de cellules de la rate. Ce projet nous permettra de confirmer ou non le rôle de ces cellules in vivo dans la production d'anticorps anti-plaquettes suite à une transfusion.

Méthodologie : La compréhension de tels mécanismes nécessite la mise en place d'un modèle animal d'allo-immunisation afin de pouvoir prélever, après la transfusion, différents échantillons (organes, sang,..) et analyser la prise en charge des plaquettes transfusées et les mécanismes immuns qui en découlent. Ce modèle repose sur la différence entre des molécules CMH (complexe majeur d'histocompatibilité), un ensemble de molécules propre à chaque individu, qu'on peut retrouver entre le donneur et le receveur. Des souris de fond génétique BALB/c (CMH de type H2-Kd) recevront plusieurs injections hebdomadaires de plaquettes provenant de souris C57BL/6J (CMH de type H2-Kb) afin de conduire à la production d'anticorps. Ce modèle nous permettra de produire des allo-anticorps plaquettaires et nous sera utile pour étudier les événements initiaux de la prise en charge des plaquettes du donneur par les cellules de la rate du receveur. Nous étudierons notamment avec précision quel sous type de cellules du receveur prendra en charge les plaquettes transfusées et quelle est la cinétique nécessaire pour cette prise en charge.

L'activation du système immunitaire du receveur suite à la transfusion sera caractérisée finement en termes de sécrétion de cytokines (des médiateurs solubles qui déterminent le type de réponse immune engagée) et en termes de quantités d'anticorps produites.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des observations suffisamment représentatives. Des expériences préliminaires au laboratoire nous ont permis de fixer à 5 le nombre de souris par conditions testées, ce chiffre tient compte de la variabilité de la réponse immune inter individus.

Remplacer : Le développement d'une réponse immune met en jeu des mécanismes cellulaires complexes qui se mettent en place sur des durées de plusieurs semaines que seules les expériences avec des animaux permettent de suivre.

Raffiner :

Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet :

- Hébergement dans des cages munies de particules de bois et enrichie avec un carré en coton compressé afin de permettre aux animaux de réaliser un nid conformément à leurs besoins comportementaux
- Accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture
- Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée des procédures expérimentales afin de limiter l'anxiété, l'inconfort, le stress et la douleur associés.
- Injection d'analgésique pendant chaque procédure.
- Mise en place d'une fiche de suivi pour suivre l'état des animaux et veiller à leur bien être tout au long de l'expérimentation. Des critères d'interruption en fonction de l'aspect clinique des animaux (grille des scores) sont mis en place afin de limiter le stress et la souffrance des animaux

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné

Ce projet nécessitera 192 souris.

11978 Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau qui se caractérise généralement par l'apparition d'épaisses plaques de peau qui se desquament. Cette maladie chronique, non contagieuse, évolue par cycles, avec des périodes de rémission. L'étendue de la maladie varie considérablement d'une personne à l'autre, peut être très désagréable ou même douloureux. Le psoriasis touche 2 à 4 % de la population occidentale, surtout les caucasiens.

D'une manière générale, les causes de la maladie ne sont pas bien identifiées et l'origine exacte de la pathologie reste inconnue. Le psoriasis est une maladie chronique qui ne se guérit pas, néanmoins, il est possible de soulager les symptômes. C'est pourquoi l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

La phase pré clinique qui consiste à l'étude de l'action des agents pharmacologiques in vivo chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments à viser anti-inflammatoire permettant de diminuer ou d'inhiber le développement de la maladie. Le psoriasis est induit par application cutanée d'une crème, l'Aldara® contenant de l'Imiquimod (IMQ). Cette crème permet l'assèchement progressif de la peau, conduisant à un érythème puis à la desquamation de cette dernière. Les animaux seront ensuite mis à mort au bout de 8 jours pour analyser différents paramètres immunologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité des molécules testées sur le développement de la maladie (signes cliniques) et de l'inflammation.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6. L'application de la crème à l'animal se fait par voie cutanée. Ce modèle induit des prurits à l'animal, liées au développement de la maladie cutanée. Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles qui sont requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études incluant au maximum 90 animaux soit 1800 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant le psoriasis.

Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. Des points limites sont mis en place et appliqués afin de limiter la souffrance de l'animal (cf. tableau points limites 3.4.13) et un cocktail anesthésique/analgésique est administré aux animaux pour limiter la douleur.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

11979 1-Objectif scientifique du projet:

La tularémie est une maladie infectieuse provoquée par une bactérie intracellulaire pathogène. Elle provoque une inflammation importante. Les médiateurs de l'inflammation peuvent être de nature lipidique et ce projet a pour but de caractériser si ceux-ci sont impliqués dans la défense de l'hôte contre la bactérie intracellulaire responsable de la tularémie.

2- Retombées attendues

Ce projet devrait permettre de mieux caractériser comment les médiateurs lipidiques affectent la réponse immunitaire de l'hôte. Une meilleure compréhension de ce système « bactérie responsable de la tularémie-immunité -médiateurs lipidiques » devrait aider au développement de nouveaux médicaments impliqués dans la réponse immunitaire chez l'hôte.

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

Ce projet est en conformation avec les 3Rs car les questions posées ici nécessitent un système complexe, et ne peuvent pas être investiguées dans des modèles in vitro ou dans des modèles in vivo utilisant des animaux invertébrés. De nombreux paramètres de l'hôte et de la bactérie seront étudiés sur chaque animal pour réduire au maximum le nombre de répétitions expérimentales. Une étude bibliographique a été réalisée pour utiliser les doses les plus adéquates de pathogènes, ainsi que d'antibiotiques au cours des expériences. En termes de raffinement, l'utilisation d'antibiotiques permettra de limiter la souffrance des animaux infectés. Les animaux seront surveillés tous les jours avec des points limites parfaitement définis. La souche bactérienne utilisée est très bien caractérisée et les souris ne resteront pas plus de 48h sans antibiotique, ce qui correspond à la phase précoce de l'infection, connue pour être moins agressive.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Animaux inclus dans ce projet : 60 souris au maximum

11980 Lors de la mise au point de nouveaux médicaments, la réalisation de tests de toxicologie est nécessaire de manière à connaître l'effet du produit sur un organisme vivant, afin de pouvoir éliminer les substances qui seraient trop toxiques pour les patients. Les tests de toxicité sont obligatoires et imposés pour tous les candidats médicaments.

Les effets toxiques suite à l'administration des produits antitumoraux représentent une forte limite à leur utilisation. L'identification des mécanismes sous-jacents à la toxicité d'un produit antitumoral, parallèlement aux mécanismes antitumoraux, est la première étape dans le développement de stratégies visant à limiter la toxicité, tout en maintenant l'efficacité thérapeutique. Possibles stratégies incluent, pour exemple, l'administration des co-traitements.

Ce projet comporte plusieurs objectifs :

1. l'évaluation de la toxicité des produits antitumoraux en association à des éventuels co-traitements chez des souris saines (i.e. pas porteuses de tumeur). L'évaluation des produits anti-tumoraux et des co-traitements chez de souris saines permet d'évaluer la toxicité suivant l'administration du produit.

2. l'évaluation de la toxicité des produits antitumoraux et des éventuels co-traitements visant à limiter leur toxicité chez des modèles murins tumoraux (i.e. souris porteuses de tumeur).

Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire afin de pouvoir appréhender les mécanismes biologiques liés à l'efficacité et à la toxicité d'un produit anti-cancéreux dans un organisme entier vivant (modélisation d'une situation clinique).

Actuellement, il n'existe pas de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable la réaction d'un organisme entier vivant suite à l'injection d'un nouveau composé et l'efficacité d'un traitement anticancéreux.

Ce projet va consister à réaliser des études de toxicité pour des produits injectés par dose unique et/ou doses répétées chez la souris : un modèle animal standard polyvalent largement décrit dans la littérature et accepté par les autorités règlementaires. L'utilisation de souris greffées avec des tumeurs humaines ou non est un modèle de référence pour l'évaluation de l'efficacité de traitements anti-cancéreux. Il s'agit d'un animal couramment employé en expérimentation animale, permettant ainsi d'une part de gérer plus facilement son bien-être au cours de l'étude et d'autre part de travailler sur des lots homogènes (âge et sexe fixés).

Le recours à l'imagerie médicale (bioluminescence, fluorescence ou scanner à rayon X) dans ce projet permet soit de suivre directement au cours du temps le développement des tumeurs et/ou de suivre l'évolution de produits anticancéreux dans l'organisme. Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives (requiert seulement une anesthésie) et ne nécessitent pas de sacrifice d'animaux au cours de l'étude (suivi des mêmes animaux au cours du temps - diminution de l'impact de la variabilité individuelle). Elles permettent ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaire.

Le stress des animaux sera pris en charge : en respectant une période d'acclimatation après réception ; en hébergeant les animaux en groupe et en conservant autant que possible les groupes formés afin de maintenir la hiérarchie établie et en leur fournissant un enrichissement spécifique.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes pour prévenir l'apparition de ces points limites et essayer -dans la mesure du possible- de les traiter seront mises en place. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe clinique anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires (mise en place d'un traitement ou mise à mort de l'animal) le plus rapidement possible. Toute anomalie clinique sera rapportée au vétérinaire sanitaire référent de l'établissement. Des mesures thérapeutiques seront prises pour traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés (injection de fluides / analgésiques, isolement, réchauffement, désinfection des plaies, etc).

Un nombre de 20 études seront réalisées au cours de ce projet. Le nombre d'animaux sera variable pour chaque étude (environ 100 par étude).

Un maximum de 2000 animaux sur l'ensemble du projet pourra être utilisé.

Le but de ce projet est de développer des traitements contrant les effets toxiques des chimiothérapies.

11981 Les maladies métaboliques sont en constante augmentation. Cette progression est inquiétante car l'obésité et le diabète, en plus d'être des pathologies invalidantes, constituent un facteur de risque pour le développement de maladies cardiovasculaires et de certains cancers. De plus en plus d'arguments démontrent que le système circadien, qui synchronise notre physiologie avec le rythme jour/nuit, est intimement lié à l'homéostasie métabolique. Des données épidémiologiques montrent par exemple que des altérations du système circadien causées par le travail en horaires décalés s'accompagnent de désordres métaboliques. Chez l'animal, des mutations des gènes de l'horloge circadienne conduisent à des anomalies métaboliques. Notre équipe s'attache à identifier les mécanismes par lesquels l'horloge circadienne contrôle le métabolisme. Nous avons découvert que l'horloge circadienne utilise la protéine KLF10 pour réguler la rythmicité du métabolisme hépatique. Les souris mâles dépourvues de KLF10 ont une augmentation de la production hépatique de glucose et une hyperglycémie, situation qui peut conduire à des désordres métaboliques plus importants. En étudiant des hépatocytes en culture de souris dépourvues de la protéine KLF10, nous avons observé que la réponse des cellules au glucose et au fructose était fortement modifiée. Notre objectif est donc de comprendre pourquoi et comment KLF10 régule la réponse des hépatocytes aux carbohydrates. La souris sera utilisée comme modèle parce que (1) son système

circadien et sa régulation du métabolisme sont très semblables à ceux de l'homme, (2) le système circadien agit à l'échelle de l'organisme entier, en particulier via une synchronisation par les hormones et la température corporelle et le métabolisme est régulé in vivo par de nombreuses interactions entre les organes, (3) des souris modifiées génétiquement sont déjà disponibles. Ces modèles génétiques n'induisent pas de phénotype dommageable en régime standards. Les animaux avec ou sans la protéine KLF10 seront soumis à un régime riche en carbohydrates ou bien utilisés pour isoler des hépatocytes primaires. Une recherche bibliographique approfondie a été effectuée afin de ne pas dupliquer des protocoles expérimentaux déjà réalisés par d'autres chercheurs. Dans le but de respecter au maximum la règle des 3R et afin d'éviter toute souffrance ou angoisse des animaux, nous mettons en œuvre les éléments de raffinement (utilisation d'analgésiques en complément des anesthésiques et pour l'isolement des hépatocytes primaires), de réduction (méthodes sensibles et à haut débit, constitution d'une banque d'échantillons) et de remplacement (culture cellulaire pour certaines expériences ne nécessitant pas d'interactions physiologiques) appropriés, et nous recourons à des points limites précoces et adaptés (contrôle quotidien de l'activité, perte de poids). Pour l'ensemble des procédures prévues, 725 souris seront utilisées sur une durée de 3 ans. Pour les expériences faites in vivo, les dommages devraient rester modérés dans la mesure où l'accumulation de graisses dans le foie en réponse au régime sucré est asymptomatique. Les bénéfices attendus du projet seront de mieux comprendre l'importance de l'horloge circadienne dans le développement des maladies métaboliques du foie comme les stéato-hépatites. Il permettra notamment d'envisager des traitements qui prendront en compte la chronobiologie du foie.

11982 Le cortex cérébral contrôle la perception sensorielle ainsi que les fonctions motrices et cognitives et joue donc un rôle essentiel dans le fonctionnement du cerveau des mammifères. La mise en place de cette structure au cours du développement embryonnaire nécessite une coordination très fine de la génération des différents types cellulaires, du contrôle de leur migration et de leur positionnement final. Un nombre croissant de données soutient l'idée que de nombreuses maladies neurologiques et psychiatriques –allant de l'épilepsie au retard mental– ont pour origine une altération de ces processus. Notre projet vise à étudier comment un certains groupes de neurones appelés « neurones transitoires » sont générés au cours du développement du cortex, comment ils sont intégrés dans les bons circuits neuronaux et quels rôles jouent certains gènes dans ces phénomènes. A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de remplacement permettant de reproduire in vitro la complexité du cortex en développement, ce qui rend l'utilisation d'un modèle murin indispensable à la réalisation de ce projet. De plus, le cerveau de ces animaux se forme de manière très similaire aux autres mammifères.

Nous étudierons les conséquences d'une dérégulation ciblée de certains gènes dans les neurones du cortex sur le développement et le comportement adulte. Plusieurs souris de lignées transgéniques ne présentant pas de phénotype dommageable seront utilisées afin de i) muter un gène d'intérêt par transgénèse ; ii) suivre la migration des cellules in vivo par marquage fluorescent ; iii) affecter les processus de sécrétion cellulaire. Dans les cas où nous ne disposons pas des lignées transgéniques nécessaires, nous allons altérer les niveaux des gènes d'intérêt ou marquer les neurones spécifiques par transfert de l'ADN plasmidique ou de virus non pathogènes dans des souris sauvages (de lignées Swiss ou C57/Bl6) ou issues de lignées transgéniques permettant de cibler l'expression des gènes d'intérêt à des populations cellulaires spécifiques. Pour manipuler l'expression génique de nos candidats spécifiquement dans les cellules transitoires au cours du développement embryonnaire, nous utiliserons un protocole d'électroporation (technique qui consiste à appliquer un champ électrique sur les membranes cellulaires ce qui augmente leur perméabilité) in utero permettant l'expression de séquences d'ADN d'intérêt dans le cerveau d'embryons sauvages ou génétiquement modifiés au cours du développement. Tous les animaux électroporés seront utilisés dans les tests statistiques permettant de limiter au maximum le nombre de femelles gestantes pour obtenir des résultats significatifs. Pour manipuler l'expression génique de populations cellulaires spécifiques au cours du développement postnatal, nous allons injecter de façon locale chez les nouveau-nés des virus non pathogènes porteur de l'ADN d'intérêt.

Afin d'étudier si les modifications ainsi induites (par lignées génétiques, électroporation in utéro ou injection virale postnatale) altèrent le comportement des souris, nous utiliserons des tests permettant d'identifier des déficits de la mémoire spatiale ou des comportements associés à la schizophrénie. Lorsque les cerveaux des souris devront être analysés après 2 jours postnataux, les animaux seront sujets à la procédure de perfusion intracardiaque afin d'assurer une fixation optimale du tissu, qui n'implique qu'une seule injection intra-péritonéale d'anesthésique.

Durant les 5 années que dure ce projet nous allons utiliser au total 2612 animaux à des stades embryonnaires, postnataux ou adultes.

L'utilisation de l'expérimentation animale pour nos travaux est rendue nécessaire par la complexité de l'environnement cortical qui ne peut pas être recréé par des approches in vitro. Toutefois, dans le respect de la règle des «3R » (remplacer, réduire, raffiner), nous diminuerons au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en atteignant la significativité statistique. Nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques lors des procédures opératoires et postopératoires, et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement. Tout signe de souffrance constaté (prostration, poil hérissé, lésion cutanée, diminution de la prise d'eau et/ou de nourriture) lors du suivi quotidien ou toute autre altération de l'état de santé conduira à une mise à mort des animaux.

A terme, les résultats de ces travaux pourront nous permettre de mieux comprendre le rôle de nos cellules d'intérêts dans le développement cortical chez la souris mais aussi d'appréhender leur importance dans la mise en place et le fonctionnement du cerveau chez l'homme, dans un contexte normal mais aussi pathologique.

11983 La réglementation en matière d'expérimentation animale publiée en 2013 oblige la formation spécifique des personnes voulant appliquer des procédures expérimentales utilisant des animaux. Cette saisine concerne la réalisation de séances de travaux pratiques (TP) dans le cadre d'un Diplôme Universitaire en matière d'Expérimentation Animale (DUEA) : Application de Procédures sur Rongeurs, formation agréée pour obtenir la certification en tant que praticien en expérimentation animale sur rongeurs. Ces TP ont pour objectif de former les étudiants aux aspects pratiques de la manipulation et de l'administration de substances sur des animaux vigiles ainsi que l'observation du comportement pour évaluer le bien-être des animaux. Les travaux pratiques seront organisés sous forme de 3 séances de 4h chacune par étudiant à laquelle s'ajoutera la séance d'examen. Chaque groupe TP accueillera au maximum 16 étudiants encadrés par 2 enseignant-chercheurs habilités. Deux séances de TP mettront en jeu des animaux vigiles (rat et souris), la 3e étant consacrée à l'utilisation de techniques de simulation en tant que méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Le but de ces TP est de former les personnes à l'étude du comportement et l'observation des animaux au plan de leur bien-être apparent (1 séance de 4h) et à leur manipulation dans le cadre de gestes courant pratiqués sur des animaux vigiles (préhension, marquage, pesée, techniques d'administration courantes) (1 séance de 4h). L'examen de l'aptitude de chaque étudiant à effectuer correctement les gestes appris consistera en une séance spécifique qui visera à mettre en situation l'étudiant pour réaliser un geste de manipulation d'un animal vigile devant un jury de 2 enseignant-chercheurs. Le nombre total d'animaux mis en jeu est de 144 par année, 72 rats et 72 souris, pour permettre à chaque étudiant de manipuler, administrer et observer un rat et une souris, et permettre l'examen pratique de chaque étudiant. Le nombre total d'animaux qui sera utilisé pour ce projet d'une durée de 5 ans sera donc de 720 (360 rats et 360 souris). La formation visant à la formation des personnes pour appliquer des procédures expérimentales non-chirurgicales sur rongeurs, l'usage d'animaux vivants est obligatoire (Remplacement). Le nombre d'animaux qui a été jugé nécessaire pour permettre le bon déroulement des TP sur animaux vivants et l'examen pratique des étudiants est de 48 (24 rats et 24 souris) pour un groupe TP, soit 144 animaux pour 3 groupes TP, capacité maximale d'accueil de la formation (Réduction). Enfin, il sera recouru à des moyens alternatifs (rats factices, photos et vidéo) ainsi qu'à des animaux dont le niveau d'anxiété sera abaissé par des moyens pharmacologiques pour permettre l'apprentissage des bons gestes de manipulation et la bonne observation des comportements lors des TP sur animaux vigiles (Raffinement). Les animaux seront surveillés quotidiennement et les points limites mentionnés dans

la saisine relatifs à un état de mal-être persistant relevés (perte de poids corporel supérieure à 10% du poids de départ sur 3 jours, état de stress apparent de l'animal se maintenant suite à la manipulation par les étudiants (maintien d'un comportement agressif, cris récurrents prostration, poils hérissés), tout signe persistant de lésion suite à l'administration de la substance (saignement, difficulté respiratoire et/ou cardiaque). Les souris utilisées pour ces TP seront mises à mort selon une méthode réglementaire et les cadavres conservés pour être utilisés dans le cadre de TP de dissection relevant d'autres diplômes. Les rats seront proposés pour être donnés et utilisés dans le cadre d'autres actions de formation sur avis du personnel de l'EU et de la structure en charge du bien-être animal de l'établissement, au besoin complété par l'avis du vétérinaire référent. Ils ne seront mis à mort selon une méthode réglementaire qu'en dernier recours. L'ensemble de ces éléments ont été décrits dans la maquette de la formation qui a permis son habilitation par la CNEA et le Ministère de l'Agriculture.

11984 *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie responsable de graves infections nosocomiales surtout chez les personnes immunodéprimées. Cette bactérie très résistante est naturellement insensible à de nombreux antibiotiques. Sa multi-résistance aux médicaments rend son traitement très difficile. C'est pourquoi l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

La phase préclinique qui consiste à étudier l'action des agents pharmacologiques in vivo chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments à visée anti-inflammatoire. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments antibiotiques. *Pseudomonas aeruginosa* souche 2310.55, de sérotype O11, pathogène de type 2, sera administré aux animaux en animalerie A2, qui seront ensuite sacrifiés à des temps définis (20h et 14 jours pour le modèle aigue et chronique respectivement) pour analyser différents paramètres immunologiques et microbiologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité in vivo des molécules testées sur le développement de la maladie (signes cliniques) et l'inflammation pulmonaire.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6. L'administration de la bactérie à l'animal se fait sous anesthésie générale afin de minimiser les situations douloureuses et stressantes. Ce modèle induit des douleurs inflammatoires aiguës à l'animal, liées au développement de la maladie pulmonaire.

Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée pendant la période d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles qui sont requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront sacrifiés par dislocation cervicale.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études, une étude comportant jusqu'à 90 animaux en fonction du nombre de molécules à tester et du nombre de concentration par molécules, soit 1800 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant l'infection par *Pseudomonas aeruginosa*. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

-Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

-Raffinement : Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien être et d'éviter au maximum leur douleur au moment de l'expérimentation. Des points limites sont mis en place et appliqués afin de limiter la souffrance de l'animal et un cocktail anesthésique/analgésique est administré aux animaux pour limiter la douleur.

-Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations

11985 Le virus de la fièvre de la vallée du Rift (vFVR) est responsable d'une maladie infectieuse grave chez les ruminants (ovins, bovins, caprins) mais également chez l'homme. Chez les animaux, la FVR entraîne des taux de mortalité chez les nouveau-nés ainsi qu'un grand nombre d'avortements chez les femelles gestantes. Chez l'homme, les symptômes peuvent être bénins (fièvre, douleurs

musculaires, maux de tête) à sévères (hépatite fulminante parfois associée à une hémorragie ou des lésions oculaires). Les épidémies périodiques de FVR sont principalement localisées en Afrique sub-saharienne, mais elles se sont étendues plus récemment à la péninsule arabique (Arabie Saoudite et le Yémen, 2000), Madagascar (2008) et l'Afrique du Sud (2010) avec d'importantes pertes économiques et des milliers de morts humains. L'émergence récente de plusieurs viroses venues d'autres continents met en évidence le risque d'introduction du vFVR en Europe, à la faveur de l'intensification des échanges internationaux mais également du fait de la présence d'espèces de vecteurs compétents (moustiques du genre aedes et culex) pour la transmission de ce virus.

L'objectif de ce projet est de poursuivre le processus d'évaluation de vaccins contre le vFVR.

Cette présente DAP s'inscrit dans la continuité des précédentes DAP (16-077 et 16-070). Il s'agit d'une DAP complémentaire qui nous permettra de tester des souches de terrain de vFVR (souches nouvellement isolées lors de récentes épidémies), en vue de challenger les candidats-vaccins.

Elle se compose de 2 procédures :

- Procédure 1 : Test de la sensibilité du modèle murin à ces souches en faisant varier différents paramètres (doses infectieuses, voies d'inoculation (IN/IP/SC) afin de mieux caractériser ces souches (pathogénèse associée).

- Procédure 2 : Mise en place des essais vaccinaux en utilisant ces souches de terrain lors du challenge pour évaluer la protection induite par les candidats-vaccins. Les schémas d'infection sont optimisés en fonction des DAP précédentes afin de réduire au maximum le nombre d'animaux.

Le projet portant sur la vaccination, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Le projet prévoit le recours à un maximum de 468 souris provenant d'élevages autorisés sur les 2 ans.

Il est à noter que lors de la mise en œuvre des DAP antérieures, nous n'avons pas utilisé l'intégralité des animaux demandés par souci de réduction du nombre d'animaux nécessaire.

Le suivi clinique des animaux sera réalisé tout au long des expériences et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur éventuel. Lors de l'administration des vaccins, les souris seront toutes anesthésiées à l'isoflurane pour éviter tout inconfort. La grille nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance (un point limite a été fixé).

11986 Les coccidioses du poulet sont des maladies parasitaires très fréquentes dans les élevages, qui peuvent avoir un impact important sur la santé, le bien-être et la croissance des oiseaux atteints. La lutte contre ces maladies est incontournable et deux approches sont majoritairement utilisées sur le terrain : des additifs coccidiostatiques dans l'aliment et des vaccins anticoccidiens administrés dans le jeune âge.

Six vaccins anticoccidiens sont actuellement autorisés, trois étant destinés aux poulets de chair. Les autres vaccins plus complets sont utilisés chez les poules pondeuses et les reproducteurs.

Tous ces vaccins sont vivants et contiennent des souches atténuées sur un critère dit « de précocité ». Néanmoins, les parasites vaccinaux se multiplient dans le tube digestif des oiseaux vaccinés et entraînent des destructions cellulaires.

De nombreux retours du terrain suggèrent que l'utilisation de ces vaccins s'accompagne d'une baisse de performances des oiseaux vers l'âge de deux semaines. Cependant, d'autres facteurs peuvent influencer la croissance des poulets, et ce ressenti nécessite d'être étudié par des essais en conditions sanitaires maîtrisées.

Aussi le but du projet s'inscrit-il dans une démarche d'accompagnement de la vaccination, afin de vérifier si les vaccins anticoccidiens sont effectivement responsables des retards observés sur le terrain et, si oui, de compenser ces effets négatifs, sinon d'agir sur d'autres leviers pour atténuer les phénomènes responsables de l'effet observé.

La première étape de ce projet est d'étudier si l'effet observé sur le terrain est confirmé dans les conditions expérimentales contrôlées.

Trois essais au maximum sont envisagés pour vérifier la reproductibilité des résultats obtenus, en cas de résultats différents lors des deux premiers essais. Sinon, deux essais seulement seront menés. Chaque essai comportera cinq lots de 60 sujets, trois lots recevant chacun un des trois vaccins destinés aux poulets de chair, un lot recevant un additif coccidiostatique de référence et un lot témoin. Les oiseaux seront vaccinés par pulvérisation de la suspension vaccinale sur le duvet (méthode utilisée dans les couvoirs) dès leur arrivée à l'âge d'un jour et seront suivis jusqu'à l'âge de 22 jours, couvrant ainsi la période pendant laquelle sont observés les retards de croissance sur le terrain.

Les oiseaux seront pesés régulièrement tout au long de l'étude, et 20 sujets seront mis à mort à 10 jours, à 16 jours et la totalité à 22 jours pour réaliser des prélèvements permettant d'évaluer le développement parasitaire, l'impact sur l'intégrité intestinale, l'influence sur la flore digestive et le suivi de marqueurs immunologiques. Les effectifs ont été calculés pour avoir une chance d'observer des différences significatives et pour pouvoir réaliser des tests statistiques paramétriques (analyse de variance) sur les poids et les gains de poids à chacune des dates de suivi.

Un total de 900 poulets sera utilisé au cas où trois essais seront nécessaires, sinon 600 oiseaux serviront à deux essais consécutifs avec résultats reproductibles.

Les oiseaux ne recevant que les vaccins aux doses autorisées, le degré de sévérité du protocole est faible. Les seules interventions sur les oiseaux seront les manipulations pour les pesées et pour les mises à mort, pratiquées par du personnel expérimenté.

Ce projet est la première étape d'un projet d'envergure qui vise à l'amélioration du contrôle des coccidioses en aviculture. Dans l'état actuel des connaissances, l'évaluation objective de l'effet de la vaccination anticoccidienne repose sur la comparaison des performances zootechniques et le suivi du développement des parasites dans des environnements maîtrisés, d'où la nécessité d'avoir recours à l'expérimentation animale. Le remplacement n'étant pas possible, nous avons réduit les effectifs au minimum pour pouvoir néanmoins réaliser des tests paramétriques (effectifs de 20 au lieu de 30 pour les analyses de variance) et le modèle d'infection expérimentale est équipé des raffinements et enrichissements suivants : élevage en groupes homogènes, papier cartonné ondulé sur tout ou partie du plancher des cages pour soulager les aplombs, rampes d'abreuvement par pipettes qui servent également de perchoirs, éclairage naturel complété par éclairage artificiel en jours courts.

11987 Garantir aux consommateurs un processus de production respectueux du bien-être animal fait partie des demandes brûlantes de la société civile, notamment pour les productions de volailles à croissance rapide. Les technologies de l'image et du son doivent permettre des analyses plus fines et plus fréquentes que celles réalisées par l'homme, et donc de prendre en charge beaucoup plus rapidement un épisode sanitaire ou de moindre bien-être. Des méthodes/outils de vidéosurveillance sont proposés permettant de mesurer des variations générales d'activité des poulets mais aucune ne permet de mesurer les principes du bien-être animal proposés par l'organisation de la santé animale. L'objectif du projet est de démontrer la faisabilité de mesures de données individuelles associées à des mesures sonores à l'échelle du groupe signant l'état de bien-être et de santé des volailles. Le projet devra aboutir à l'élaboration de spécifications techniques qui serviront de base au développement d'un outil.

Une partie de ce projet consiste, à collecter pour la première fois, des données sonores en conditions expérimentales saines ou infectieuses. Ces protocoles permettront de mesurer le comportement et les symptômes cliniques dans des situations contrôlées et contrastées. Ces expérimentations nécessiteront l'utilisation de 120 poulets dans le respect de la règle des 3R et afin de pouvoir caractériser les sons émis au cours d'un processus infectieux, tel que la bronchite infectieuse aviaire. Il y aura deux lignées de volailles utilisés pour qualifier ces enregistrements sonores : 1) des poulets exempt d'organismes pathogènes spécifiques (modèle de référence de la bronchite infectieuse) et 2) des poulets conventionnels d'élevage. Après infection, les animaux présenteront des symptômes cliniques et des problèmes respiratoires (toux, râles). C'est donc ce râle émis par la volaille qui sera donc enregistré et analysé à l'aide d'un algorithme développé au cours de ce même projet. Les résultats de ces expérimentations aboutiront à définir des stratégies

pour la captation du son comme indicateur de santé et du bien-être animal, en vue d'une application chez les éleveurs.

Remplacement : il n'existe aucune méthode alternative pour développer une bronchite infectieuse induisant du vocalisme (râle) chez le poulet.

Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature, les premières données expérimentales obtenues sur le modèle infectieux et l'expérience des différents partenaires de ce projet.

Raffinement : il y aura un enrichissement social (vie en groupe et visite bi-journalière des animaliers) et des structures d'enrichissement (litière, perchoirs, lampes chauffantes et objets suspendus) afin de mimer un environnement naturel.

11988 La chimiothérapie est utilisée dans le traitement de nombreux cancers. Les agents chimio thérapeutiques classiques éliminent les cellules qui se divisent comme les cellules cancéreuses, mais ils sont aussi actifs sur les cellules normales de l'organisme qui se divisent rapidement comme les cellules du tube digestif, du sang et de la peau. Cette action est responsable des effets secondaires négatifs de la chimiothérapie. Il est nécessaire de trouver des agents anticancéreux de nouvelle génération qui ciblent les cellules cancéreuses et épargnent les cellules normales. Le but de ce projet est de tester les propriétés anti-cancéreuses d'un nouvel agent chimio thérapeutique dans un modèle préclinique de cancer chez la souris. Pour créer des tumeurs chez l'animal, des cellules tumorales seront greffées à des souris immunodéficientes, puis ces souris seront traitées avec cet agent durant plusieurs semaines. Le développement tumoral sera mesuré sur animaux vivants par une technique d'imagerie sensible et non invasive. A l'issue de l'expérience, les tumeurs seront prélevées et la réponse thérapeutique sera évaluée.

La réalisation du projet s'attache à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, le suivi dans le temps de la croissance tumorale par des examens non invasifs permet d'utiliser le même animal du début à la fin de l'expérience et en conséquence de réduire le nombre d'animaux. Afin de remplacer au maximum l'utilisation d'animaux, des travaux en amont ont été réalisés au laboratoire sur des cellules cancéreuses en culture. Ces essais permettent d'avoir une idée précise de la dose optimale active qui sera directement transposée chez l'animal. De plus, la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux comme certaines injections sera réalisé sous anesthésie permettant le raffinement de l'étude. L'ensemble du projet nécessitera 160 souris.

11989 Ce projet constitue une étude préclinique d'un programme de développement d'un nouveau traitement ciblant une maladie neurologique.

Dans ce projet, nous souhaitons tester les effets bénéfiques d'une thérapie génique sur des animaux génétiquement modifiés. Ces animaux sont un modèle animal du syndrome de l'X fragile.

Le syndrome de l'X fragile (FXS) est une maladie génétique rare associée à un déficit intellectuel léger à sévère qui peut être associé à des troubles du comportement et à des signes physiques caractéristiques.

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

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

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

Deux sous-projets seront mis en place:

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

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

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

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

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

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

11990 Chez les Mammifères, la mémoire de travail permet de retenir temporairement l'information pour accomplir une tâche ou guider un comportement. Elle est aussi appelée "mémoire à court terme". Le cortex préfrontal (PFC) et le cortex pariétal postérieur (PPC) sont des zones du cerveau, indispensables pour la mémoire de travail. De nombreuses études expérimentales et computationnelles ont suggérées que les connexions nerveuses entre ces deux régions étaient renforcées après apprentissage d'une tâche comportementale mobilisant la mémoire de travail. Mais l'interaction au niveau des réseaux de neurones et au niveau des zones de communications entre les neurones, les synapses, entre ces deux aires corticales est peu connues.

Nous souhaitons comprendre comment les informations allant des neurones du PFC aux neurones du PPC sont intégrées au niveau de neurones individuels et au sein de la population de neurones et de comprendre comment cette intégration est modifiée par l'optimisation de la mémoire de travail. Notre objectif à terme est de déterminer les processus de plasticité synaptique mis en jeu au cours de la mémoire de travail et d'en disséquer les mécanismes cellulaires.

Notre plan expérimental sera donc le suivant : les animaux subiront une chirurgie cérébrale implantatoire d'électrodes très fines pour pouvoir 1) mesurer les courants électriques qui permettent aux neurones de communiquer entre eux (technique d'électrophysiologie in vivo) 2) de rapporter dans le cerveau des molécules sensibles à la lumière, les opsines qui permettent de modifier ces courants électriques (technique d'ontogénétique). Ces mesures seront faites lorsque l'animal effectue une tâche comportementale qui implique la mémoire de travail (labyrinthes en Y). Les

cerveaux seront ensuite prélevés pour pouvoir enregistrer des courants électriques sur tranches de cerveaux ou des études histologiques.

L'étude des mécanismes de mémoire nécessite d'utiliser des animaux vivants puisque pour l'heure aucun modèle *in vitro*, ou d'approches de neurocomputation ne peuvent mimer de façon complète les capacités du cerveau.

Ce projet utilisera 40 souris C57BL6/J durant 1 an. Dans le respect du R de réduire de la règle des 3R, nos groupes expérimentaux seront dimensionnés pour utiliser le plus petit nombre possible d'animaux pour avoir néanmoins des statistiques solides. Dans le respect du R de raffiner, les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, et au cours des étapes de l'apprentissage, et accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Pour cela, les chirurgies stéréotaxiques se feront sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès leur réveil et qui sera maintenue tant que l'animal montre des signes de souffrance. Au cours des cours des étapes de l'apprentissage, les animaux sont légèrement restreints alimentaires, une surveillance accrue de leur poids et de leur état général et un accès immédiat à la nourriture au constat d'un mal être. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

11991 Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) ont émergé au milieu du XX^{ème} siècle et touchent plus fréquemment les pays industrialisés. L'environnement (habitudes alimentaires, mode de vie occidental) joue un rôle crucial dans le développement et la progression des MICI. L'alimentation est étroitement liée à la composition de notre flore intestinale, elle-même liée à la muqueuse intestinale qui est altérée dans les MICI. Les additifs alimentaires sont de plus en plus utilisés, tels que les carraghénanes (E407), carboxyméthylcellulose (E466), nanoparticules d'oxyde de titane (E171), comme agent d'épaississement, agent blanchissant et émulsifiants. Il devient nécessaire d'étudier l'impact de tels additifs sur les MICI.

Afin de connaître l'effet de ces additifs sur l'évolution de ces maladies, la barrière intestinale et l'inflammation, des modèles murins de MICI, modèles qui développent spontanément une atteinte inflammatoire dommageable et modérée du tube digestif (colite, diarrhée), doivent être utilisés. Les additifs alimentaires testés seront: E407, E466 et E171.

Ce projet permettrait de mieux comprendre l'impact d'additifs alimentaires couramment rencontrés dans notre mode de vie occidental, sur ces pathologies (MICI) aux conséquences lourdes. Si une augmentation des symptômes est observée, cela montrera la toxicité accrue des additifs alimentaires sur un tube digestif fragilisé. Les résultats contribueront aussi à une meilleure compréhension de ces maladies occidentales et aideront à mettre en place de nouvelles thérapies ciblées.

Ce projet, d'une durée de 5 ans et impliquant des modèles murins (modèles spontanés de MICI) s'effectuera en respectant la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer).

- L'impact de ces additifs sur l'évolution de ces maladies, la barrière intestinale et l'inflammation ne peut s'effectuer que sur des modèles animaux (impossibilité de remplacement). Seuls des modèles murins expérimentaux présentant des caractéristiques de MICI (atteinte inflammatoire spontanée et modérée du tube digestif) peuvent être utilisés. Les additifs alimentaires seront administrés dans l'eau de boisson (biberons) des souris pour une durée de 4 semaines. Les animaux seront euthanasiés en fin de procédure pour analyse histologique du tube digestif.

- Les animaux en expérimentation seront surveillés par un personnel qualifié et par l'opérateur afin de déceler au plus tôt des modifications comportementales et cliniques liées à l'inflammation

intestinale. Un examen général de l'état de santé des souris sera effectué 2 fois par semaine par l'expérimentateur. Tout changement significatif (jeûne, prostration, poil hérissé, perte de poids des animaux) alertera et pourra conduire rapidement à l'euthanasie de l'animal concerné en cas de dépassement des points limites. Une perte visible de poids ou une souffrance avérée sera considérée comme point limite et conduira au sacrifice de l'animal.

- Les analyses statistiques ont été réalisées afin de déterminer le nombre optimal (et donc minimal) d'animaux nécessaires par groupe pour valider une différence significative si elle existe. Un effectif de 10 souris par groupe a été estimé nécessaire pour la réalisation du projet, avoir des résultats reproductibles et observer une différence significative, si elle existe, avec un risque alpha inférieur à 5% et un risque bêta inférieur à 10%. Soit un maximum de 250 animaux pour l'ensemble du projet.

11992 Chez la vache laitière, les besoins nutritionnels augmentent considérablement après la mise basse du fait de la production laitière. L'appétit et l'ingestion alimentaire n'augmentent que progressivement et durant toute la phase de déficit énergétique, la vache mobilise dans ses réserves. Ce mécanisme constitue un mécanisme d'adaptation essentiel des animaux. Toutefois, avec la hausse du niveau de production laitière, ce phénomène s'est accentué depuis une trentaine d'années de sorte que la mobilisation est parfois excessive et peut induire des troubles métaboliques ou de reproduction.

La question scientifique posée est la suivante : le couplage entre production laitière et mobilisation corporelle est-il total et inéluctable, auquel cas l'augmentation de production se traduit par plus de mobilisation avec ses conséquences ; ou bien existe-t-il une variation de la vitesse d'adaptation de l'ingestion aux besoins, limitant la mobilisation et les troubles associés ?

Pour répondre à cette question, un dispositif très spécifique est prévu, en tirant parti des informations génétiques disponibles sur les taureaux d'insémination. Ainsi, chaque taureau est caractérisé par le potentiel génétique qu'il transmet en moyenne à ses filles pour un grand nombre de caractères. Parmi ces caractères pour lesquels une évaluation génétique est disponible, nous nous sommes intéressés principalement à : la production laitière et l'état corporel. A ce jour, aucune évaluation génétique n'est disponible pour la capacité d'ingestion, caractère très difficile à mesurer à grande échelle.

Ainsi, des taureaux de même potentiel laitier mais de niveau génétique de note d'état corporel très différent ont été utilisés. Ainsi, on devrait disposer de deux lignées divergentes de vaches Holstein différant entre elles pour leur potentiel de mobilisation alors que leur niveau de production devrait être identique. L'objectif de l'étude est donc de comparer les trajectoires de production, d'ingestion, de mobilisation et de récupération entre les deux lignées pour répondre à la question initialement posée : a-t-on pu déconnecter génétiquement production et mobilisation, ceci à niveau de production donné (et assez élevé), ce qui suppose une adaptation de l'ingestion plus rapide dans une lignée que dans l'autre. Au-delà des différences entre lignées, on dispose également d'estimation de valeurs génétiques individuelles, permettant de raffiner l'analyse.

Les objectifs de notre étude sont (i) d'étudier la prédisposition génétique de vaches Prim'Holstein en lactation à mobiliser leurs réserves corporelles pour la production de lait, en recherchant les causes de variabilité génétique entre individus élevés dans un même environnement, (ii) de comprendre le lien avec les autres mécanismes impliqués dans l'efficacité alimentaire. Les données de cette étude contribueront à un projet plus large pour disposer d'index sur l'ingestion et/ou l'efficacité alimentaire, à des fins de sélection.

Le principe des 3R a été pris en compte dans la construction du projet :

- Remplacement : Les mécanismes étudiés mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte qu'il est impossible de reproduire dans un modèle cellulaire, de culture d'organe ou in silico.

- Réduction : la variabilité du caractère étudié doit être suffisante pour des analyses génétiques. Ce projet porte sur environ 220 femelles en lactation, primipares ou multipares sur 5 campagnes. Il participera à la constitution d'une base de données internationale sur l'efficacité alimentaire et pourra être complété de campagnes supplémentaires si la divergence observée et les effectifs ne sont pas suffisants pour répondre complètement aux objectifs. La sélection divergente pratiquée

par l'utilisation des taureaux devrait permettre un gain de puissance substantiel, réduisant ainsi l'effectif requis.

- Raffinement : Afin de minimiser la douleur, les prises de sang nécessaires au protocole seront réalisées au niveau de la queue des animaux, peu fréquentes, pour des volumes ne dépassant pas 2*6ml et espacées d'au moins 24h. Les conditions d'hébergement et d'alimentation répondent aux normes d'élevage en intérieur avec une aire paillée, un robot de traite et une ration complète distribuée dans des auges en accès libre. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. La prophylaxie et le traitement des animaux en cas d'affection ne sont pas modifiés par la mise en œuvre du projet. Les animaux sont gardés en vie en fin d'expérimentation.

11993 Les polyphénols sont des molécules naturelles issues du métabolisme secondaire des végétaux. Ils sont largement répandus dans l'alimentation et les principales sources en sont les fruits et les légumes mais également certaines boissons (vin, thé, café, jus de fruits). Le resvératrol et la viniférine (dimère du resvératrol) sont des stilbènes présents principalement chez la vigne (baies de raisin et vin). De nombreux travaux mettent en évidence des activités biologiques intéressantes de ces 2 polyphénols pour la prévention ou le traitement de différentes pathologies majeures. Les effets les plus documentés sont des effets antioxydants, anti-inflammatoires, anti-cancérogènes, mais également anti-obésités par une modulation de la prolifération des tissus adipeux dans des régimes hypercaloriques. L'efficacité de ces activités biologiques dépend en grande partie de leur biodisponibilité, c'est à dire de leur capacité à être absorbées et distribuées dans l'organisme. Malheureusement, la majorité des études in vivo d'administrations orales démontrent que ces deux stilbènes ont une biodisponibilité très faible (inférieure à 2 %) qui pourrait être attribuée à une faible bioaccessibilité, une faible absorption au travers de la barrière intestinale et une importante biotransformation. Les effets bénéfiques de ces stilbènes apportés sous forme libre seraient donc très limités.

Ce programme expérimental rentre dans un projet global de recherche qui vise à augmenter la biodisponibilité de ces molécules pour pouvoir atteindre des concentrations plasmatiques et tissulaires compatibles avec une efficacité biologique. A l'heure actuelle, seule une méthodologie classique de mesure de la biodisponibilité, par une approche in vivo nous permettra de comparer les effets de deux formes d'administration pour pouvoir par la suite envisager une utilisation de ces molécules encapsulées dans des approches expérimentales chez l'animal et chez l'homme.

Nous planifions de décomposer notre protocole expérimental en deux phases :

- la première phase sera réalisée par un protocole expérimental (protocole n°1) qui nous permettra de caractériser et de comparer la biodisponibilité des molécules libres et encapsulées (ajustement du nombre d'animaux par groupe, amplitudes des doses administrées, cinétiques de prélèvements, encadrement des valeurs attendues, pertinence des résultats).

- la deuxième phase sera réalisée par un autre protocole expérimental (protocole n°2) dont le design sera établi en fonction des résultats obtenus dans la première phase. Nous pourrons alors réaliser un plan d'échantillonnage optimal, pour mettre en évidence d'éventuelles différences dans la distribution tissulaire des stilbènes d'intérêt en fonction de la forme d'administration. L'analyse concomitante de la distribution des métabolites de ces composés nous permettra aussi de pouvoir apprécier l'activité de biotransformation au sein de plusieurs organes.

En accord avec les exigences de la règle des 3R, dans les procédures des deux protocoles expérimentaux, l'administration préalable d'un analgésique (buprénorphine) et l'utilisation d'une procédure d'anesthésie (isoflurane), permettront de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. De même, pendant les périodes de stabulation des animaux, il sera rajouté, des dispositifs de raffinement (boîtes, tunnels...) dans les cages et un suivi journalier des animaux sera assuré par le personnel de l'animalerie. Les résultats de la première phase conditionneront la réalisation de la deuxième. En effet, d'une part, en l'absence d'amélioration significative de la biodisponibilité des stilbènes par encapsulation, la phase 2 ne sera pas réalisée. D'autre part l'interprétation des données de la phase 1 nous permettra d'ajuster au mieux la dose administrée et les temps de prélèvement pour la phase 2.

Dans une stratégie de remplacement, en fonction des résultats de la première phase du protocole expérimental, une approche *in vitro* sur des modèles de culture de cellules intestinales pourra être envisagée pour comprendre l'influence de la forme d'administration sur les mécanismes d'absorption et sur le métabolisme. Ces deux considérations auront un rôle déterminant pour prévoir ajuster au mieux les conditions expérimentales des protocoles pour une réduction des groupes d'animaux et du nombre d'animaux par groupe dans un respect au plus proche des conditions répondant aux exigences de la règle des 3R sur l'utilisation des animaux de laboratoire à des fins d'expérimentation.

Au total, après optimisation des différentes procédures de ce programme de recherche, le nombre total d'animaux utilisés sera de 140 rats mâles de souche Wistar.

11994 Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'est attaché à caractériser le rôle de la protéine sélénoprotéine T (SELENOT) dont la séquence a été identifiée, pour la première fois dans notre équipe, comme étant un des gènes stimulés par le neuropeptide PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) au cours de la différenciation neuronale. Le rôle crucial de cette dernière a été démontré par la génération d'un KO pour ce gène non viable chez la souris. Toutefois, malgré cette observation, son rôle dans le cerveau reste encore aujourd'hui peu connu. Des études moléculaires plus approfondies ont montré que l'expression de la SELENOT est maximale au cours du développement embryonnaire puis diminue jusqu'à devenir indétectable au niveau cérébral à l'âge adulte. Ainsi, afin de comprendre le rôle de cette protéine au cours du neurodéveloppement et du vieillissement, nous proposons de caractériser le phénotype de souris transgéniques présentant un défaut d'expression de la SELENOT dans les cellules neurales. En effet, ces animaux sont issus d'une lignée de souris KO conditionnelles chez lesquelles le gène codant la SELENOT est sélectivement invalidé dans les cellules neurales (neurones et glies). Pour rappel, cette lignée, dont l'entretien fait l'objet d'une autre saisine, a été produite par croisement de souris dans lesquels les exons contenant la séquence codante de la SELENOT sont flanqués par des sites LoxP avec des animaux exprimant la recombinaison CRE sous le contrôle du promoteur de la nestine.

Des analyses préliminaires ont montré que les souris jeunes adultes présentaient une hyperactivité locomotrice qui disparaissait avec l'âge. Ceci suggère qu'une déficience en SELENOT serait responsable d'une altération du système dopaminergique. Pour cette raison, notre projet vise à comparer l'activité locomotrice chez la souris âgée par rapport à celle des jeunes ainsi que d'évaluer l'impact d'injection aiguë et chronique d'agonistes et d'antagonistes dopaminergiques chez ces animaux. Ainsi, différents groupes de souris seront générés en fonction de l'âge (2-3 mois et 8-12 mois), du génotype (KO SELENOT et Contrôles) et d'un traitement aigu d'agonistes ou d'antagonistes dopaminergiques des récepteur D2 et D3. Par la suite, les animaux seront soumis à différents tests comportementaux afin de déterminer les altérations comportementales induites par la déficience en SELENOT et l'impact du vieillissement sur ces dernières. Ces tests permettront d'évaluer la coordination motrice, l'anxiété, la cognition, la résignation et le seuil douloureux. De plus, une étude préliminaire sera aussi menée afin de caractériser d'avantage les neurones issus de la zona incerta dont il a été montré une altération chez les souris KO et qui pourraient être impliqués dans les altérations phénotypiques observées.

Au final, 730 animaux seront nécessaires pour cette étude. Le nombre d'animaux par groupe est fixé à 20 par groupe afin de pouvoir réaliser des analyses statistiques pertinentes. Cet effectif tient compte de la mise à mort anticipée (nécessaire dans le cas où l'animal aurait atteint un point limite de souffrance non acceptable), de décès éventuels, mais aussi du fait que le vieillissement pourrait induire une variabilité et une létalité importante au sein des groupes. Dans l'optique du respect de la règle des 3R, et afin de réduire le nombre total d'animaux, les animaux nécessaires aux prélèvements d'organes, indispensables pour réaliser des études biologiques ultérieures, seront ceux qui auront été utilisés pour les analyses fonctionnelles. De plus, le sang et les organes reproducteurs seront également prélevés post mortem, en plus du cerveau, pour un projet parallèle mis en place dans notre équipe. De manière similaire, des échantillons de peau pourraient également être utilisés afin de mener des expériences réalisées en culture cellulaire.

Les conditions d'hébergement seront conformes aux conditions recommandées. Les souris seront hébergées sous un cycle jour/nuit de 12h avec un accès illimité à l'eau et à la nourriture. La température des pièces d'hébergement et d'expérimentation sera maintenue à $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. A partir du 2ème de mois de vie, les animaux seront pesés toutes les semaines et habitués à la manipulation. Avant chaque test comportemental, les souris seront familiarisées à l'environnement expérimental pendant 30min. Durant l'expérimentation, un suivi quotidien sera réalisé afin de détecter un éventuel signe de souffrance tels qu'une perte importante de poids, une posture anormale, une prostration, des plaies et un changement de comportement. Si l'état de l'animal ne s'améliore pas dans les 48h, il sera admis qu'un niveau de souffrance intolérable est atteint et que la mise à mort de ce dernier doit être réalisée. Durant la durée de l'expérimentation, toutes les dispositions seront prises afin de minimiser la souffrance et l'anxiété des animaux.

11995 Exploiter le système immunitaire pour reconnaître et détruire les cellules tumorales a été l'objectif central de l'immunothérapie contre le cancer. Au cours des dernières années, il y a eu un intérêt accru pour l'optimisation de cette technologie afin d'en faire un traitement cliniquement réalisable. L'une des principales modalités de traitement dans l'immunothérapie du cancer a été la thérapie cellulaire adoptive. En utilisant cette approche, des cellules souches hématopoïétiques ou des cellules T cytotoxiques spécifiques à une tumeur ou des cellules « Natural Killer » sont perfusées chez des patients cancéreux dans le but de reconnaître, de cibler et de détruire des cellules tumorales. L'immunothérapie adoptive a montré récemment des résultats extrêmement prometteurs en utilisant des cellules modifiées, en particulier des cellules T portant un récepteur d'antigène chimérique. Dans ce projet, nous allons utiliser différentes stratégies de développement de cellules artificielles afin de les rendre plus efficaces contre les tumeurs et moins toxiques pour le patient. Leur efficacité sera largement testée in vitro. Cependant, ni les modèles expérimentaux in vitro ni les modèles mathématiques ne peuvent réellement remplacer les expériences in vivo d'immunothérapie adoptive des cellules modifiées contre les tumeurs. Par conséquent, les réponses anti-tumorales seront analysées chez des souris immunodéprimées avec des tumeurs humaines et injectées avec des cellules modifiées artificiellement en laboratoire. Ce modèle de souris immunodéprimée a été choisi pour éviter le rejet des cellules humaines.

Les expériences utilisant ce modèle animal proposées vont permettre d'identifier de nouveaux mécanismes anti-tumoraux et de nouvelles méthodes de traitement qui seront directement applicables dans le domaine d'immunothérapie des cancers.

Pour l'ensemble du projet, le nombre de souris nécessaires faisant l'objet de la présente demande sera de 8130 souris. Toutes les précautions seront prises pour réduire le nombre d'animaux utilisés, tout en assurant une valeur significative des résultats obtenus. En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux selon des points limites listés dans une grille de score.

11996 L'insuffisance cardiaque est une maladie fréquente, touchant un million de personnes en France et dont la fréquence d'apparition a doublé en 10 ans. Elle correspond à l'incapacité du cœur à pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins en oxygène et en nutriments de l'organisme. Les médicaments actuels de l'insuffisance cardiaque visent à ralentir le rythme cardiaque et diminuer la pression artérielle pour reposer et préserver le cœur. Malgré leur efficacité, la mortalité reste très importante chez ces patients qui ont un confort de vie gravement altéré et subissent des hospitalisations répétées.

Il existe une différence importante entre homme et femme en ce qui concerne l'apparition de la maladie, les femmes avant la ménopause étant protégées de l'insuffisance cardiaque, les traitements et leurs effets secondaires. La différence sexuelle est une donnée qui doit être mieux considérée afin d'améliorer la prise en charge des patients.

Le cœur se contracte entre 50 et 80 fois par minute pour distribuer le sang à tout l'organisme 24h sur 24. Pour assurer ce travail très intense, il a besoin d'une grande quantité d'énergie qu'il puise dans les nutriments issus de la digestion. Cette production d'énergie est assurée principalement

par les mitochondries qui sont les centrales énergétiques de la cellule. Dans l'insuffisance cardiaque le cœur semble incapable d'utiliser ces nutriments correctement et ceci aboutit à un métabolisme que l'on dit altéré. De plus, plusieurs études montrent que celui-ci pourrait être une des composantes des différences homme/femme en cardiologie. A l'heure actuelle, peu de médicaments essaient de corriger ce problème.

Notre équipe s'intéresse à une protéine impliquée dans une voie de signalisation importante de l'état métabolique des cellules. Elle pourrait représenter une cible thérapeutique judicieuse dans l'insuffisance cardiaque mais ses effets précis dans le contrôle du métabolisme cardiaque ne sont pas vraiment connus. Pour étudier ces effets, nous avons généré un modèle original de souris transgéniques qui présente une invalidation de notre protéine d'intérêt et de sa voie spécifiquement dans le cœur. Nos résultats préliminaires ont montré uniquement chez les souris mâles, et en condition basale, une altération du fonctionnement des mitochondries.

Notre projet vise donc à clarifier ce phénomène et à étudier la spécificité sexuelle des effets cardiaques de notre protéine d'intérêt. Le but de ce projet est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer à plus long terme des thérapies nouvelles et adaptées au sexe pour le traitement de l'insuffisance cardiaque.

Dans le cadre du projet, toutes les procédures sont conçues pour respecter le principe éthique des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement): (i) une planification minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude, et en conservant une puissance statistique suffisante pour observer un effet, (ii) les fonctions cardiovasculaires sont étudiées par des méthodes non invasives, (iii) l'insuffisance cardiaque sera induite en respectant au maximum les procédures de bien-être animal et en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques, (iv) afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés, en fin d'expérimentation les tissus prélevés seront partagés entre les domaines explorés, (v) le recours à des animaux se justifie par la nécessité d'étudier la fonction cardiaque dans un contexte physiologique et physiopathologique complexe et multifactoriel. L'objectif de recherche est de mieux comprendre l'implication du système hormonal dans les effets cardiaques observés suite à l'invalidation de notre protéine d'intérêt. L'utilisation d'animaux se justifie également par l'impossibilité d'obtenir des lignées de cellules cardiaques adultes. De plus, elle se justifie également par l'impossibilité de simuler ex vivo la mise en place de la défaillance cardiaque qui est un processus complexe qui intervient au sein d'une multitude d'altérations physiologiques.

Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils ne subissent aucun stress. Afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement de l'enrichissement sera ajouté dans leurs cages. Un total de 144 souris sera nécessaire pour le projet.

11997 Contexte :

Le projet a pour but d'évaluer un nouvel appareil de mesure de la pression artérielle (PA) chez le chat.

L'hypertension artérielle chez l'animal est méconnue du fait d'une symptomatologie fruste en début d'évolution. De plus, pour la majorité des praticiens vétérinaires, les appareils actuellement disponibles sur le marché sont difficiles à utiliser chez le chat.

Objectifs :

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité d'un nouvel appareil de mesure de la pression artérielle chez le chat qui rende la mesure de la PA plus aisée.

Avantages et dommages :

La finalité du projet est de pouvoir diagnostiquer plus précocement les chats hypertendus et ainsi de les traiter au plus tôt.

Les dommages induits par les procédures peuvent être du stress et une gêne liée aux administrations de produits, aux variations de pression artérielle, et aux mesures réalisées avec les dispositifs commerciaux actuels. En cas d'implantation d'un dispositif de mesure directe de la

pression artérielle par chirurgie, la douleur sera gérée et contrôlée par l'administration d'analgésiques, et un suivi post-opératoire adapté.

Informations sur les espèces utilisées :

Les études de ce projet seront réalisées sur l'espèce cible (le chat). Jusqu'à 240 animaux seront utilisés sur 5 ans, dont la moitié sera implantés.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Pour évaluer un dispositif de mesure de la PA, le recours à des méthodes alternatives est insuffisamment informatif. Le recours à l'espèce cible reste indispensable pour mettre au point et valider un dispositif de mesure de la PA chez le chat.

Réduction : les effectifs sont évalués au plus juste (connaissance des dispositifs déjà sur le marché, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre de chats utilisés en limitant le risque d'études non concluives. Les animaux utilisés devront être représentatifs de la population féline générale en termes de sexe, poids, et autres particularités pouvant influencer sur la mesure de la PA.

Raffinement : Pour chaque étude, une période d'acclimatation systématique des chats est prévue dans le but de limiter leur stress. Une surveillance adaptée est mise en place pour assurer une prise en charge rapide des animaux si cela s'avérait nécessaire. Pour réduire l'inconfort et la gêne provoqués par l'administration de médicaments et les manipulations, des opérateurs qualifiés réalisent une contention adaptée de l'animal. Si nécessaire (en cas d'implantation d'un dispositif de mesure directe de la pression artérielle), un protocole d'anesthésie et d'analgésie est prévu pour garantir le bien-être des animaux. Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge pour maximiser leur confort et leur bien-être. Dans la majorité des cas, les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements adaptés du milieu sont mis en place.

La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

11998 L'endothélium vasculaire joue un rôle primordial dans la régulation du tonus vasculaire et du contrôle de l'hémostase ainsi que dans la pathogenèse de l'athérosclérose. Les malades présentant un ou plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire développent une dysfonction endothéliale qui se manifeste par une atténuation de la réponse dilatatrice aux stimuli physiologiques ou neuro-humoraux qui agissent en libérant du monoxyde d'azote (NO) de l'endothélium pour relaxer les cellules musculaires lisses sous-jacentes.

Cette dysfonction endothéliale est le plus souvent la conséquence de l'atteinte athéromateuse de l'endothélium, en particulier au niveau des coronaires, des circulations cérébrales et des membres inférieurs, qui sont le siège de complications ischémiques à l'occasion d'événements thrombotiques. Tous les facteurs de risque cardiovasculaire ont un effet commun au niveau de la paroi artérielle : ils augmentent la production de radicaux libres qui entraînent cette diminution de la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium. Enfin, l'endothélium est le site d'une régulation fine de l'hémostase, avec une influence prédominante des facteurs pro-coagulants en cas de dysfonction endothéliale. Les maladies cardiovasculaires représentent actuellement la cause la plus fréquente de décès dans les pays industrialisés.

De nombreuses études cliniques ont montré que la présence d'une dysfonction endothéliale a une valeur prédictive quant à la survenue de complications cardio- et cérébro-vasculaires. De nombreux traitements pharmacologiques existent déjà pour traiter l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie et le diabète, traitements connus pour améliorer la fonction endothéliale notamment en limitant le stress oxydant. Néanmoins, à ce jour, la prise en charge de la dysfonction endothéliale reste insuffisante. La recherche de nouveaux médicaments innovants visant spécifiquement cette dysfonction est indispensable pour restaurer les fonctions de l'endothélium qui sont mal contrôlées par les traitements disponibles à l'heure actuelle.

L'objectif de ce projet est de développer un modèle de dysfonction endothéliale induit chirurgicalement par sténose partielle de vaisseaux (artères carotide, abdominale ou fémorale) afin de modifier les contraintes rhéologiques qui s'exercent sur la paroi vasculaire et ainsi favoriser, en

association avec des facteurs de risque comme le diabète ou les dyslipidémies, le développement de lésions d'athérosclérose. La pathologie vasculaire est ensuite évaluée au cours du temps par des méthodologies non invasives comme les mesures de perfusion tissulaire (doppler) et de flux sanguin vasculaire (échographie) la résistance à l'effort sur tapis de course, la mesure de force de contraction musculaire ou la bio-imagerie vasculaire ; ou en point final par des méthodologies invasives comme l'histologie ou la biologie moléculaire sur des prélèvements tissulaires. Les méthodologies de suivi non-invasif permettent de réduire le nombre d'animaux à inclure dans les études. La finalité est d'évaluer le potentiel thérapeutique de traitements ciblant de nouvelles voies de signalisation cellulaires.

La coordination entre toutes les spécialités impliquées dans les études (modélisation in silico, pharmacocinétique, formulation, biochimie...) permettra de définir pour chaque nouveau candidat médicament des protocoles optimisés afin de réduire le nombre d'études in vivo.

Des biostatisticiens apporteront aux expérimentateurs leur support pour l'élaboration du design expérimental, pour optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études (en fonction de leur objectif, leur design, de la variabilité des paramètres mesurés, de la taille des effets à mettre en évidence et de l'historique des données) et pour effectuer ou revoir les analyses statistiques.

Les procédures décrites dans ce projet sont validées par le comité d'éthique. Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes et européennes, intégrant tous les aspects relatifs à l'utilisation des animaux (origine, hébergement, soins, manipulation, expérimentations) et la prévention de la douleur et du stress. Tous les expérimentateurs ont suivi les formations réglementaires nécessaires à la pratique de l'expérimentation animale. Ils sont ainsi formés aux gestes impliquant la manipulation des animaux, l'observation des signes cliniques et à la chirurgie. Les étapes chirurgicales sont réalisées sous anesthésie profonde et analgésie pré-, péri et post-opératoire de manière à limiter au maximum la douleur. Par ailleurs un suivi quotidien des animaux en expérimentation à l'aide de grille de score (ex. dans les modèles de diabète de type I) est mis en place afin de suivre les critères d'alarme spécifiques comme la cicatrisation, la prostration, la perte de poids, la présence d'ascite (diabète) ou l'hypothermie avérée.

Le nombre maximal d'animaux qui devraient être utilisés dans le cadre de ce projet est de 6000 rats et 6000 souris sur 5 ans.

11999 Les personnes travaillant avec des animaux de laboratoire doivent maîtriser des gestes techniques plus ou moins complexes : administrations, prélèvements, chirurgies... Leur formation initiale doit parfois être complétée par une formation spécifique, en fonction des études qu'ils devront réaliser et de l'évolution des connaissances et pratiques. Le but de ce projet est de former les chercheurs et techniciens aux actes chirurgicaux par des personnes expertes et d'offrir à tout nouvel arrivant les compétences expérimentales, la possibilité d'être formé aux gestes techniques faits dans nos animaleries. Le projet concerne également le personnel souhaitant maintenir ses compétences. Ces formations donneront les moyens de raffiner les procédures expérimentales en évitant le stress et la souffrance animale liés à une non maîtrise du geste technique et réduire le nombre d'animaux nécessaires. La personne en formation sera systématiquement accompagnée par une personne dont l'expertise pour le geste est validée par le responsable de suivi des compétences de l'entablement. Les formations en chirurgie seront réalisées par des vétérinaires spécialisés dans la chirurgie des rongeurs- Remplacement. Certains gestes techniques de base peuvent être enseignés et appris sur des objets inertes ou des mannequins plastiques. Néanmoins la mise en condition réelle sur l'animal reste essentielle pour l'apprentissage des techniques chirurgicales. En effet, il n'existe pas à ce jour de méthodes de substitution pouvant restituer fidèlement les comportements et réactions des animaux et/ou la manipulation des tissus vivants. Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser au maximum 640 souris et 100 rats sur une durée de 5 ans. - Réduction. Dans la très grande majorité des cas, les animaux utilisés dans ces formations seront préférentiellement des individus surnuméraires de nos élevages, dont le génotype ou les caractéristiques font qu'ils sont inutilisables dans les projets. Plus rarement, il pourra s'agir d'animaux commandés pour une étude mais n'ayant pas été utilisés et devant être euthanasiés ;

une supervision étroite garantira une utilisation optimale des animaux en minimisant le risque d'erreur. - Raffinement. Les animaux bénéficient d'un enrichissement social et physique dans les zones d'hébergement. Ils seront euthanasiés après chaque créneau de formation, les procédures étant classées légères ou sans réveil dans le cas d'animaux anesthésiés. De plus, les animaux seront observés quotidiennement afin de s'assurer de leur bon état général et toute procédure potentiellement stressante sera réalisée sous anesthésie générale afin de préserver le bien-être animal. Les procédures sont réalisées par du personnel déjà formé aux sciences et techniques des animaux de laboratoire, mais devant acquérir une expertise supplémentaire.

12000 Le but de ce projet est d'évaluer une potentielle amélioration des signes de la myopathie à agrégats tubulaires grâce à une approche thérapeutique dans un modèle murin pour cette maladie. Notre travail est axé sur les maladies génétiques rares affectant les muscles. Pour comprendre le rôle physiologique des gènes touchés dans la myopathie à agrégats tubulaires, on a d'abord utilisé des modèles cellulaires puis des modèles animaux murins. Grâce à ces deux modèles nous avons pu établir les causes de cette maladie ainsi que de possibles cibles thérapeutiques. Nous planifions à présent, d'utiliser un modèle murin pour mieux comprendre les causes de la maladie et valider les cibles thérapeutiques qui ont déjà été sélectionnées in vivo. Pour ce projet on vise à tester l'efficacité thérapeutique d'un composé qui empêche l'effet toxique de la mutation trouvée chez les patients de la myopathie à agrégats tubulaires. Cet effet toxique de la mutation est une entrée excessive de calcium dans les cellules qui est réduit grâce à l'action du composé qui sera utilisé dans ce projet. On rajoutera ce composé, qui se trouve normalement dans la peau des raisins rouges, dans la nourriture des souris. L'absence de toxicité de ce composé à la concentration choisie a déjà été montrée sur d'autres études avec des souris. On étudiera ensuite la possible amélioration de la maladie dans notre modèle murin pour la myopathie à agrégats tubulaires. L'utilisation des souris est indispensable pour étudier les causes de la maladie et l'amélioration du phénotype car ceci pourrait être transféré à l'humain très rapidement car ce composé est déjà utilisé comme complément alimentaire.

Les souris seront analysées in vivo / in situ / in vitro et les tissus seront prélevés pour des expériences in vitro ultérieures. Nous avons préalablement utilisé des modèles cellulaires pour cette maladie afin de déterminer les molécules qui pourraient être testés in vivo dans la souris pour réduire le nombre d'animaux. Par contre, seulement le modèle murin permet d'étudier l'amélioration des signes de la maladie dans plusieurs tissus (REPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une par jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris au maximum / groupe sera utilisé pour s'assurer que l'étude soit statistiquement et scientifiquement valable. Afin de s'assurer que le bien-être des animaux est respecté, les souris seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude) (RAFFINEMENT). Un maximum de 200 souris sera utilisé.

12001 Comprendre comment les circuits neuronaux s'organisent et intègrent les informations sensorielles afin de générer un comportement approprié est un objectif fondamental des neurosciences. Ceci nécessiterait de pouvoir observer des cellules individuelles simultanément en différents endroits du cerveau, ce qui est aujourd'hui très limité chez les vertébrés en raison de la grande taille du cerveau et de son opacité. Notre projet vise à introduire un nouveau modèle animal de vertébré qui résolve ces deux problèmes. Il s'agit d'un poisson d'eau douce qui présente à la fois une très petite taille et une transparence presque totale même à l'âge adulte, lorsque le circuit neuronal et les comportements associés sont matures. Ceci en fait un modèle très prometteur pour l'analyse du fonctionnement du cerveau vertébré adulte à une résolution cellulaire.

Le présent projet vise à caractériser le comportement de cette espèce à différents stades larvaires et adultes et à analyser l'activité neuronale associée grâce principalement à des techniques non invasives de microscopie. Ces techniques ont toutes été déjà mises au point pour le poisson zèbre *Danio rerio*, un vertébré proche de ce nouveau modèle mais plus gros et transparent uniquement

pendant les premiers jours de vie embryonnaire et larvaire. Nous prévoyons d'utiliser 6910 animaux (larves et adultes) pour ce projet.

Remplacement : Les études en culture cellulaire ne permettent pas de reconstituer les interactions cellulaires complexes permettant d'analyser la mise en place et la fonctionnalité d'un circuit neuronal. La complexité structurelle et fonctionnelle du système nerveux empêche l'utilisation des modèles *in silico* ou *in vitro*, notre projet nécessite donc une approche *in vivo* sur l'animal. L'établissement d'un nouveau modèle de poisson classé dans les vertébrés inférieurs permettra de remplacer au moins partiellement l'expérimentation sur des vertébrés supérieurs.

Réduction : Nous limiterons le nombre d'animaux utilisés aux besoins statistiques de nos analyses. Dès que cela est possible nous utiliserons les mêmes animaux pour différentes expériences, en particulier pour les stades adultes, afin de répondre aux questions des différents aspects du projet, diminuant d'autant le nombre d'individus nécessaires. De plus, la plupart de nos expérimentations étant des observations de la réponse de l'animal à un stimulus donné (visuel ou moteur), nous utiliserons en contrôle le comportement du même animal avant le stimulus. Ce contrôle interne permet de diviser par 2 le nombre d'animaux nécessaires et supprime l'erreur due à la variabilité inter-individus.

Nous élèverons le nombre minimal d'embryons nécessaires au maintien d'une lignée (60 adultes). La population adulte de poissons utilisée pour produire les embryons est ainsi restreinte pour limiter le nombre d'animaux mais suffisamment développée pour assurer des conditions de reproduction efficaces pour les études envisagées.

Raffinement : Nous nous appliquerons à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse. Toutes les analyses sur tissu seront conduites après euthanasie d'animaux. Les autres manipulations, invasives ou nécessitant une immobilisation, seront conduites sur animaux anesthésiés. Dans chaque cas, nous suivrons les signes visibles d'un animal souffrant et procéderons si nécessaire à une interruption de l'expérience ou à une euthanasie. Concernant l'élevage, des poissons trop vieux pour la ponte ou présentant des signes de maladie seront euthanasiés afin d'éviter tout risque de souffrance.

12002 INTRODUCTION

Les cellules souches ecto-mésenchymateuse de la muqueuse olfactive (CSEM-MO) sont des cellules multipotentes qui se situent dans la lamina propria et l'épithélium de la muqueuse olfactive. Leur potentiel thérapeutique a été testé avec succès dans différents modèles animaux de paraplégie, de la maladie de Parkinson, de surdité et d'amnésie.

La réparation nerveuse périphérique constitue un véritable défi pour le patient et le chirurgien. Devant les limites du traitement chirurgical, les chercheurs se sont unis pour proposer une approche de thérapie cellulaire capable de limiter l'inflammation et d'améliorer la croissance axonale. Notre équipe a pour objectif de conduire une étude pré-clinique basée sur la greffe autologue de cellules souches olfactives dans un modèle rat de lésion du nerf facial afin d'étudier le potentiel thérapeutique de la greffe de ces cellules souches par des évaluations fonctionnelle, électrophysiologique et histologique.

METHODE

Le modèle animal est le rat adulte syngénique Fischer, et 68 rats de 8 semaines seront répartis en 4 groupes. Le paradigme de réparation étudié sera la suture avec interposition de tuteur veineux, en présence ou non de cellules souches olfactives préparées dans du lysat plaquettaire, comparé à la suture nerveuse directe (Gold Standard). L'évaluation à 3 mois portera sur la récupération fonctionnelle (mouvement des vibrisses, fermeture palpébrale, symétrie faciale, syncinésies œil-bouche), l'activité électrophysiologique (syncinésies, réflexe de clignement, récupération du signal électrique), et l'histologie (comptage des fibres myélinisées, taille des fibres et de la gaine de myéline, densité axonale par immunofluorescence, densité des cellules transplantées marquées à la GFP par immunofluorescence, coloration rétrograde).

Les rats seront opérés sous anesthésie générale : induction par inhalation d'isoflurane à 5% puis entretien de l'anesthésie au masque par inhalation d'isoflurane à 2,5%. De plus, l'antalgie post-

opératoire sera assurée par des injections intramusculaires de Nalbuphine à visée curative, et par administration de Doliprane dans l'eau de boisson à visée préventive. Le nombre d'animaux a été évalué à partir des études proches de celle-ci précédemment effectuées dans notre laboratoire et dont les statistiques avaient été établies pour réduire au minimum le nombre d'animaux opérés. Les conditions d'hébergement, de soins, d'antalgie et les méthodes utilisées seront adaptées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux qui seront observés pluriquotidiennement durant toute la durée du protocole expérimental. Le suivi du poids des animaux, de la prise alimentaire, de l'aspect physique externe ainsi que l'apparition de sécrétions, d'excrétions anormales seront minutieusement surveillés et permettront de contrôler l'absence de souffrance, en complément de l'examen du comportement de l'animal. Tout signe de souffrance entraînera l'euthanasie des animaux.

RESULTATS ATTENDUS

Le bénéfice attendu serait une amélioration de la récupération fonctionnelle, électrophysiologique et histologique après paralysie faciale traumatique grâce à la greffe de cellules souches olfactives.

La mise en évidence d'un potentiel thérapeutique de la greffe de cellules souches olfactives dans un modèle rat de lésion du nerf facial sera suivie par la réalisation d'un essai clinique pilote de phase I/IIa destiné à tester la faisabilité, la sécurité et l'efficacité de la greffe autologue de cellules souches olfactives chez des patients ayant subi un traumatisme du nerf facial, prévue dans le cadre de la troisième série de travaux.

Ce résultat pourrait être étendu aux autres nerfs périphériques, et donc améliorer la prise en charge de nos patients victimes de lésions des nerfs périphériques.

12003 Le traitement des infections bactériennes implique le plus souvent l'administration d'antibiotiques chez les animaux comme chez les êtres humains. Ces antibiotiques sont éliminés par les organismes par différentes voies, dont l'excrétion dans le lait. La présence de traces d'antibiotiques dans le lait destiné à la consommation humaine peut favoriser l'émergence de bactéries résistantes. Les laboratoires pharmaceutiques vétérinaires ont l'obligation d'étudier la vitesse d'élimination des antibiotiques dans le lait, afin de définir le temps à attendre après l'arrêt des traitements avant la commercialisation du lait. Parallèlement, certaines agences sanitaires recommandent de suivre la présence potentielle d'antibiotiques dans le lait maternel afin d'évaluer le risque d'exposition des enfants allaités.

La présence de résidus d'antibiotiques à l'état de traces dans le lait dépend de l'importance du passage de ces molécules depuis le sang vers la mamelle et de leur vitesse d'élimination dans le lait qui varie en fonction des caractéristiques de la molécule et de la physiologie et de la composition du lait propres à chaque espèce. Ces derniers paramètres sont moins bien connus et leurs effets sur la persistance des antibiotiques dans le lait sont difficiles à prédire.

Dans ce projet la cinétique de différentes molécules d'antibiotiques dans le sang et le lait des trois principales espèces productrices de lait destiné à la consommation humaine (vaches, brebis, chèvres) sera étudiée. Quatre molécules antibiotiques ayant des propriétés différentes et représentatives de la diversité des molécules disponibles seront utilisées.

Ce projet transversal a un double objectif :

1. En médecine vétérinaire : moins de données de cinétique sont disponibles chez la chèvre et la brebis que chez la vache. Les données obtenues permettront ainsi d'améliorer les connaissances pharmacocinétiques de ces molécules d'antibiotiques pour ces 2 espèces. D'autre part, des modèles informatiques innovants seront développés à partir des données collectées chez les 3 espèces afin de (1) mieux caractériser les différences physiologiques entre espèces qui influent sur l'excrétion lactée ; (2) mieux prédire la persistance de ces molécules dans le lait et notamment lors de l'utilisation de doses différentes ; (3) réaliser des extrapolations à d'autres espèces.

2. En médecine humaine : grâce aux modèles informatiques développés à partir des données chez les animaux, une extrapolation vers l'Homme sera réalisée afin de pouvoir prédire les

concentrations d'antibiotiques retrouvées dans le lait maternel de femmes ayant reçu un traitement antibiotique.

La règle des 3R a été prise en compte :

- Remplacer : afin de pouvoir développer des modèles pertinents pouvant être extrapolés à l'Homme, il est nécessaire d'avoir des données expérimentales de cinétique dans le lait et le sang. Les modèles sur cultures de cellules n'étant pas représentatifs de la complexité d'un processus physiologique tel que le passage de la barrière « sang/lait », le recours à des animaux est incontournable.

- Réduire : le nombre d'animaux sera minimisé grâce à la puissance des modèles utilisés qui permettent d'analyser des données éparses et qui suffisent pour bien appréhender la variabilité biologique. Ainsi, six animaux par espèce et par molécule d'antibiotique étudiée (4 molécules étudiées) seront utilisés, soit un maximum de 72 animaux (24 vaches, 24 chèvres, 24 brebis). L'utilisation des modèles informatiques développés permettra ensuite de prédire la pharmacocinétique de ces antibiotiques selon d'autres scénarios, sans utilisation supplémentaire d'animaux.

- Raffiner : les animaux seront maintenus dans leurs conditions d'élevage habituelles. Les antibiotiques utilisés sont tous des spécialités vétérinaires ayant une autorisation de mise sur le marché et seront administrés aux doses préconisées par le fabricant, ce qui limite le risque d'effet secondaire. Les prises de sang seront réalisées par des opérateurs formés dans des conditions de contention assurant la sécurité des animaux et des opérateurs et minimisant les sources d'inconfort pour les animaux. Cependant, des points limites et critères d'arrêt ont été définis afin de permettre une intervention rapide sur les animaux.

12004 Notre équipe se consacre à l'étude d'une myopathie congénitale qui affecte des êtres humains et des chiens et que nous avons pu reproduire expérimentalement chez la souris. Il s'agit dans ces trois espèces d'une myopathie modérée qui n'affecte pas la longévité des individus mais se caractérise par une faiblesse musculaire et qui se rattache à un groupe de myopathies congénitales plus large, comprenant des myopathies sévères. Notre projet vise à mieux comprendre sur le plan fondamental les mécanismes conduisant aux défauts observés et à rechercher des pistes thérapeutiques découlant de cette compréhension, qui pourraient donner lieu à un développement préclinique pour cette myopathie et potentiellement d'autres du même groupe. Grâce aux souris mutantes que nous avons développées, nous avons pu démontrer que leur faiblesse musculaire est due à la fois à un défaut de croissance des muscles au cours de leur développement et à un défaut de production d'énergie par les muscles au cours d'un effort, tout au long de la vie.

Des découvertes récentes menées par une équipe de collaborateurs ont montré que la mutation chez la souris d'un autre gène, lui aussi responsable de myopathies, était capable de corriger totalement, par interaction génétique, deux myopathies sévères appartenant au même groupe que celle que nous étudions. Nous souhaitons déterminer si la mutation de ce gène est aussi capable de corriger la myopathie que nous étudions. Le cas échéant, cela apporterait des éléments-clés dans la compréhension des mécanismes communs à ces gènes dans les myopathies et élargirait le potentiel thérapeutique remarquable offert par cette interaction génétique.

Pour cela, nous croiserons des souris porteuses de chacune des mutations en jeu et étudierons les souris issues de ces croisements et possédant les deux mutations, en comparaison avec celles n'en possédant qu'une et qui seront myopathes (notre mutation) ou saines (mutation d'interaction), ou aucune, qui seront saines.

Les procédures envisagées consisteront en une pesée hebdomadaire pour évaluer la croissance musculaire, qui sera analysée de manière approfondie par des analyses histologiques post-mortem, une évaluation de leur métabolisme comprenant des injections et des prélèvements en nombre limité sur une courte durée et une alimentation riche en graisse, et enfin, une évaluation de leurs capacités musculaires sur tapis de course.

A l'issue de ces procédures, chaque animal donnera lieu à des prélèvements post-mortem en très grand nombre afin de recueillir le maximum de données de chaque animal utilisé grâce à des

analyses transcriptomiques (expression des gènes), histologiques, biochimiques, de microscopie électronique et de biologie moléculaire.

A ce stade des connaissances et des méthodes substitutives disponibles, et en complément d'analyses *in vitro* que nous réalisons en parallèle, l'utilisation de souris mutantes pour les deux gènes d'intérêt est seule à même de révéler une interaction génétique entre ces deux gènes pour le développement et le fonctionnement musculaire.

La nécessité de deux croisements successifs pour obtenir les animaux d'intérêt et la nécessité de disposer de suffisamment d'animaux pour déterminer de manière fiable le niveau de correction apporté aux souris myopathes font que 308 animaux seront nécessaires pour cette étude, sur cinq ans. Une partie des animaux générés sera utilisée comme reproducteurs et les animaux des lots expérimentaux participeront aux trois procédures, ce qui limitera au maximum le nombre d'animaux utilisés. Enfin, chaque animal donnera lieu à un très grand nombre d'analyses post-mortem.

Nous apportons un soin extrême dans notre animalerie aux conditions de vie de nos souris, avec beaucoup de matériel d'enrichissement, une densité d'animaux adaptée à leur âge et un confort optimisé pendant la maternité. Par ailleurs, les animaux qui pourraient présenter une faiblesse musculaire à un moment de leur vie feront l'objet de soins très attentifs afin de pallier cette faiblesse ponctuelle si cela s'avère possible ou de les euthanasier avant le développement d'une souffrance dans le cas contraire.

In fine, notre projet devrait permettre de découvrir de nouveaux mécanismes impliqués dans le développement et le fonctionnement musculaire, et possiblement, d'offrir une piste thérapeutique pour le développement de molécules susceptibles de corriger tout ou partie des problèmes musculaires rencontrés dans certaines myopathies congénitales.

12005 Notre équipe se consacre à l'étude d'une myopathie congénitale qui affecte des êtres humains et des chiens et que nous avons pu reproduire expérimentalement chez la souris. Il s'agit dans ces trois espèces d'une myopathie modérée qui n'affecte pas la longévité des individus mais se caractérise par une faiblesse musculaire et qui se rattache à un groupe de myopathies congénitales plus large, comprenant des myopathies sévères. Notre projet vise à mieux comprendre sur le plan fondamental les mécanismes conduisant aux défauts observés et à rechercher des pistes thérapeutiques découlant de cette compréhension, qui pourraient donner lieu à un développement préclinique pour cette myopathie et potentiellement d'autres du même groupe. Grâce aux souris mutantes que nous avons développées, nous avons pu démontrer que leur faiblesse musculaire est due à la fois à un défaut de croissance des muscles au cours de leur développement et à un défaut de production d'énergie par les muscles au cours d'un effort, tout au long de la vie. Ce défaut de croissance musculaire est plus précisément dû à un défaut de fusion des cellules précurseurs des muscles au cours du développement. Il est irréversible et conduit à une réduction de la taille de chaque muscle tout au long de la vie.

Des découvertes récentes menées par une équipe de collaborateurs ont montré que la mutation chez la souris d'un autre gène provoque au contraire un excès de fusion des cellules précurseurs musculaires, aboutissant à des fibres musculaires anormalement larges. Nous souhaitons déterminer si la mutation de ce gène serait capable de corriger le défaut de croissance et de fonctionnement musculaire dans la myopathie que nous étudions. Le cas échéant, cela apporterait des éléments-clés dans la compréhension des mécanismes à l'œuvre dans la myopathie que nous étudions et offrirait une piste thérapeutique pour les myopathies congénitales présentant un défaut de croissance musculaire.

Pour cela, nous croiserons des souris porteuses de chacune des mutations en jeu et étudierons les souris issues de ces croisements et possédant les deux mutations, en comparaison avec celles n'en possédant qu'une et qui seront myopathes (notre mutation) ou saines (mutation d'interaction), ou aucune, qui seront saines.

Les procédures envisagées consisteront en une pesée hebdomadaire pour évaluer la croissance musculaire, qui sera analysée de manière approfondie par des analyses histologiques post-mortem, ainsi qu'une évaluation de leurs capacités musculaires sur tapis de course.

A l'issue de ces procédures, chaque animal donnera lieu à des prélèvements post-mortem en très grand nombre afin de recueillir le maximum de données de chaque animal utilisé grâce à des analyses transcriptomiques (expression des gènes), histologiques, biochimiques, de microscopie électronique et de biologie moléculaire.

A ce stade des connaissances et des méthodes substitutives disponibles, et en complément d'analyses in vitro que nous réalisons en parallèle, l'utilisation de souris mutantes pour les deux gènes d'intérêt est seule à même de révéler une interaction génétique entre ces deux gènes pour le développement et le fonctionnement musculaire.

La nécessité de deux croisements successifs pour obtenir les animaux d'intérêt et la nécessité de disposer de suffisamment d'animaux pour déterminer de manière fiable le niveau de correction apporté aux souris myopathes font que 388 animaux seront nécessaires pour cette étude, sur cinq ans. Une partie des animaux générés sera utilisée comme reproducteurs et les animaux des lots expérimentaux participeront aux deux procédures, ce qui limitera au maximum le nombre d'animaux utilisés. Enfin, chaque animal donnera lieu à un très grand nombre d'analyses post-mortem.

Nous apportons un soin extrême dans notre animalerie aux conditions de vie de nos souris, avec beaucoup de matériel d'enrichissement, une densité d'animaux adaptée à leur âge et un confort optimisé pendant la maternité. Par ailleurs, les animaux qui pourraient présenter une faiblesse musculaire à un moment de leur vie feront l'objet de soins très attentifs afin de pallier cette faiblesse ponctuelle si cela s'avère possible ou de les euthanasier avant le développement d'une souffrance dans le cas contraire.

In fine, notre projet devrait permettre de découvrir de nouveaux mécanismes impliqués dans le développement et le fonctionnement musculaire, et possiblement, d'offrir une piste thérapeutique pour le développement de molécules susceptibles de corriger le défaut de croissance musculaire rencontré dans certaines myopathies congénitales.

12006 L'équipe s'intéresse au contrôle hormonal et/ou nutritionnel des sécrétions des cellules du tissu adipeux et leur implication dans les dysrégulations métaboliques associées à l'obésité (diabète, le cancer, le vieillissement). Les conditions de fonctionnement des tissus/organes peuvent être profondément altérées dans des situations d'adaptation physiologique (surcharge pondérale), de perte de fonctionnalité (insulino-résistance, inflammation, vieillissement) ou pathologiques (obésité, diabète, accumulation de lipides dans le foie). Chacun des tissus clefs de la régulation énergétique (tissu adipeux, foie, muscle) sécrète des molécules (dites "tissuekines") capables d'agir de façon locale ou dans le sang. Nos travaux nous ont permis d'identifier une nouvelle tissuekine qui permet de diminuer significativement la glycémie en activant son récepteur exprimé par le muscle et le tissu adipeux à la fois chez la souris et l'Homme. Ces résultats mettent en évidence un rôle majeur de cette voie de signalisation dans le diabète et son intérêt thérapeutique pour une stratégie antidiabétique. Cependant, un nouveau ligand de ce même récepteur a été identifié très récemment et peut être clivée en plusieurs formes. La présence de ce second ligand dans l'organisme peut soit avoir les mêmes effets bénéfiques sur la glycémie, soit avoir aucun effet voir même bloquer l'effet antidiabétique du premier ligand. Notre connaissance/expertise en matière de sécrétion/régulation et de réponse métabolique aux hormones, nous amène à explorer plus avant les effets de ce deuxième ligand et ses potentielles capacités à améliorer ou aggraver certains désordres liés aux dysfonctions métaboliques. Dans ce but, nous utilisons des animaux sauvages et des animaux n'exprimant plus le premier ligand (souris mâles ou femelles car la différence de réponse au régime hypercalorique selon le sexe est à prendre en compte) dont l'alimentation permet une surcharge énergétique (régimes riches en graisse et/ou en sucre) entraînant la mise en place d'une obésité et le développement progressif de désordres de la régulation de la glycémie (résistance à l'insuline, diabète). De manière à évaluer l'effet des différentes formes de ce second ligand, ces dernières peuvent être administrées par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée. Divers paramètres physiologiques seront suivis de façon non invasive lors des expérimentations (prise de poids, mesure de la prise alimentaire/hydrique, pourcentage de masse grasse, comportement, activité physique...), dans certains cas une prise de sang de petit volume permettra de suivre des index métaboliques (glycémie et taux d'insuline dans le sang lors de tests fonctionnels). Enfin à la mise à

mort, une étude précise des paramètres sanguins mais également tissulaires sera effectuée. De tels protocoles n'entraînent aucune souffrance animale car les animaux sont mis à mort avant que les désordres métaboliques provoqués n'engendrent une quelconque invalidité. Compte tenu de la variabilité des paramètres biologiques généralement observée au sein d'un groupe et de la durée des protocoles, des groupes de 8 animaux seront formés afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiques (principe de réduction). L'ensemble du projet nécessitera au maximum 1128 souris (mâles et femelles), en comptant les mises au point des protocoles (choix de la dose par exemple). Nous travaillerons sur des souris adultes qui répondent bien au régime gras. Leur utilisation sera répartie sur différentes expérimentations : 3 formes du second ligand à tester au cours des cinq prochaines années.

Les procédures seront réalisées dans le respect du bien être animal pour limiter la souffrance, la douleur ou l'anxiété des animaux (les souris seront hébergées par cages de 4, des carrés de ouate seront placés dans les cages pour leur permettre de faire un nid et le cas échéant - agressivité -, des igloos seront ajoutés dans les cages), et en respectant des points limites préalablement définis (une perte de poids atteignant 20%, un comportement anormal grave - arrêt d'alimentation -, un mutisme de plus de 24 h conduiront à un arrêt d'urgence de l'expérimentation). L'observation quotidienne des animaux sera réalisée par du personnel qualifié de la zootechnie et de l'équipe de recherche.

12007 La fièvre jaune (FJ) est une infection virale aiguë qui demeure toujours une cause importante de maladies hémorragiques dans plusieurs pays africains et sud-américains, pouvant causer la mort des individus touchés. D'après l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 2007, 206 000 cas de fièvre jaune ont été recensés dans douze pays africains (Bénin, Burkina Faso, Cameroun, Côte d'Ivoire, Ghana, Guinée, Libéria, Mali, Nigeria, Sénégal, Sierra Leone et Togo), provoquant 52 000 décès. L'OMS a estimé alors que l'épidémie pourrait faire entre 1,5 et 2,7 millions de morts, si aucune action n'était menée en matière de prévention vaccinale. Le moyen le plus efficace de se prémunir de la FJ est la vaccination.

Un vaccin efficace vivant issu d'une souche virale atténuée par passage sur embryon de poulet existe (STAMARIL), mais de manière exceptionnelle (moins d'un cas pour cent mille vaccinations) survient des effets secondaires importants avec des symptômes proches de ceux d'une FJ et pouvant aboutir au décès dans environ la moitié des cas.

Ce projet a pour objectif de caractériser l'immunogénicité d'un plasmide codant pour le virus atténué de la FJ, utilisé en lieu et place du virus vivant sur embryon de poulet, dans le but d'évaluer l'efficacité immunologique de ce plasmide, n'induisant pas d'effets secondaires. Ce plasmide ayant déjà été évalué sur différentes espèces animal (caprins, bovins et caviidés) sans observer d'effets secondaires, il s'agit ici de confirmer cette observation sur une autre espèce, la volaille.

3 conditions différentes d'injections du plasmide seront réalisées afin de déterminer laquelle présente la meilleure immunogénicité : une injection in-ovo dans le liquide amniotique au 18ème jour d'incubation, une injection intramusculaire in-ovo au 18ème jour d'incubation et une injection sous cutanée le lendemain de l'éclosion.

1000 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 10 études de 100 individus permettant une évaluation statistique significative.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable l'efficacité d'un vaccin dans un organisme entier vivant.

Le modèle œuf de poule embryonné-poussin a été choisi car c'est un modèle classiquement utilisé pour la réalisation et la production de virus vivants atténués.

Afin de réduire le stress des animaux durant leur période de développement in-ovo, les œufs seront placés dans une couveuse spécifique, avec des conditions environnementales adaptées (hygrométrie, température, retournement des œufs, etc).

Afin de réduire le stress des animaux après l'éclosion, les poussins seront hébergés de manière collective, en parc, en maintenant des conditions environnementales adaptées à leur âge (température, hygrométrie, éclairage, etc).

Afin d'éviter une contention longue pouvant engendrer un stress pour les animaux, une anesthésie volatile sera systématiquement utilisée pour les actes techniques requis tout au long de l'étude et les animaux endormis seront placés sur un tapis chauffant afin de maintenir leur température corporelle.

Toute anomalie clinique sera rapportée au vétérinaire sanitaire référent de l'établissement. Des mesures thérapeutiques seront prises pour traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés (injection de fluides / analgésiques, isolement, réchauffement, désinfection des plaies, etc).

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes permettant de détecter l'apparition de ces points limites et d'essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires (mises en place de traitement ou mise à mort des animaux) le plus rapidement possible.

Ce projet pourra permettre de proposer sur le marché de nouvelles solutions thérapeutiques contre la FJ.

12008 Les paralysies laryngées bilatérales, souvent séquellaires de traitements chirurgicaux, altèrent profondément la qualité de vie des patients, dégradant leur respiration et/ou leur voix. Les traitements classiques imposent de faire un choix entre ses deux fonctions majeures. Seule la réinnervation laryngée sélective, permet de restituer une mobilité fonctionnelle du larynx. Mais la technique chirurgicale reste complexe. Sa simplification est l'objectif de nombreuses recherches actuelles, notamment dans le but d'être appliquée à un modèle de transplantation laryngée chez l'homme. Des thérapies cellulaires sont développées en ce sens.

Les Cellules Gliales Olfactives (CGOs) sont des cellules macrogliales qui accompagnent les neurones olfactifs primaires depuis la muqueuse olfactive jusqu'au bulbe olfactif. Elles peuvent être cultivées à partir de biopsies de muqueuse olfactive, peu iatrogènes, chez l'homme, permettant d'envisager des stratégies de transplantations cellulaires autologues, dans le cadre de la régénération nerveuse périphérique. Ainsi, dans des modèles de paralysie laryngée unilatérale chez le rat (section/anastomose du nerf vague ou du nerf laryngé inférieur), ces cellules ont permis d'améliorer la réinnervation fonctionnelle du larynx. Il apparaît que cet effet thérapeutique est le fait de la présence de précurseurs de cellules gliales (PCGOs), maintenus à l'âge adulte chez les mammifères par la neurogenèse continue existant au sein du système olfactif primaire. Ces résultats prometteurs doivent être confirmés par des études expérimentales pré-cliniques, mimant les situations rencontrées en clinique humaine. Ainsi, la réhabilitation impose le plus souvent le « pontage » d'une perte de substance nerveuse. En pratique clinique, après une lésion traumatique ou chirurgicale du nerf laryngé inférieur, les 2 extrémités de ce dernier sont difficiles à retrouver. Il peut, cependant, être mis en évidence au niveau de son entrée dans le larynx. Il est alors possible de le raccorder à un autre nerf grâce au pontage de la perte de substance.

Le but de cette étude est de montrer que l'interposition d'un tuteur contenant des CGOs et/ou des PCGOs entre le nerf vague et le larynx améliore la réinnervation laryngée après section du nerf laryngé inférieur.

Pour cela, 115 rats Fisher seront utilisés: 85 rats males Fisher syngéniques de 10 semaines seront répartis en 5 groupes et 30 rats males Fisher de 3 semaines serviront pour mettre en place la partie de la culture cellulaire. Un nombre minimum d'animaux seront donc inclus dans chaque groupe afin de permettre une étude statistique fiable de cette technique.

Les rats opérés seront sous anesthésie générale : induction par inhalation d'isoflurane à 5% puis entretien de l'anesthésie au masque par inhalation d'isoflurane à 2,5%.

Le nombre d'animaux a été évalué à partir des études proches de celles-ci précédemment effectuées dans notre laboratoire et dont les statistiques avaient été établies pour réduire au

minimum le nombre d'animaux opérés. Les conditions d'hébergement, de soins, d'antalgie et les méthodes utilisées seront adaptées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux qui seront observés pluriquotidiennement durant toute la durée du protocole expérimental. Le suivi du poids des animaux, de la prise alimentaire, de l'aspect physique externe (état de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses) ainsi que l'apparition de sécrétions, d'excrétions anormales seront minutieusement surveillés et permettront de contrôler l'absence de souffrance, en complément de l'examen du comportement de l'animal (agitation, prostration...). Tout signe de souffrance entraînera l'euthanasie des animaux.

12009 Ce projet de Recherche repose sur le développement d'un nouvel outil thérapeutique dans une approche de radioimmunothérapie préciblée (PRIT) du cancer du sein. Cette stratégie repose sur l'injection d'un anticorps ciblant la tumeur, suivi par celle d'une sonde radioactive qui va reconnaître l'anticorps fixé sur la tumeur et ainsi délivrer son énergie à cette dernière (action thérapeutique). Cela permet d'irradier sélectivement les tumeurs tout en limitant la toxicité périphérique. Malgré les excellents résultats observés, il n'existe à ce jour aucun essai clinique de PRIT en raison d'une ingénierie difficile. Pour remédier à ces verrous scientifiques, nous proposons le développement de nouveaux outils pour permettre une meilleure visualisation des tumeurs par imagerie et une efficacité de la radiothérapie accrue. Ces outils devraient permettre une meilleure sélection des patients pouvant répondre à une radiothérapie interne.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3R est de 146 sur 5 années.

Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée.

En effet, de nombreuses études in vitro réalisées en amont ont permis de remplacer l'utilisation des animaux. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier qui permettront d'évaluer les effets potentiellement indésirables de cette nouvelle approche thérapeutique.

Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. L'utilisation et la validation de nouvelles techniques d'imagerie permettent également de réduire le nombre d'animaux.

La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette). Lors des procédures expérimentales (inoculation des cellules et traitement), les souris seront placées sous anesthésie générale afin d'éliminer toute douleur potentielle et de réduire l'angoisse générée par la manipulation.

Finalement, ce projet devrait permettre de valider de nouveaux outils de radiothérapie interne du cancer du sein, extrapolable à d'autres types de cancer, dans un contexte de médecine personnalisée.

12010 La prostatite est une inflammation de la prostate qui peut prendre une forme aiguë ou chronique. Cette pathologie qui touche 9% de la population masculine, est caractérisée par des douleurs pelviennes, des troubles urinaires et des troubles de la sexualité. L'étiologie de cette pathologie reste inconnue. Plusieurs facteurs seraient en cause (facteurs urinaires, alimentaires, sexuels, influence du stress, de la pratique sportive...) dans le déclenchement des douleurs. De la même façon, le mécanisme physiopathologique de la prostatite reste un mystère. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement satisfaisant pour cette pathologie.

Les méthodes alternatives, dans le cas de l'étude de la douleur, sont inexistantes. Ces limitations rendent donc incontournables le recours à l'expérimentation animale afin de valider de nouvelles molécules antalgiques et/ou anti-inflammatoires pour traiter la prostatite. Un modèle expérimental de prostatite induite par l'injection de carragénine chez le rat a été décrit dans la littérature comme

modèle de choix pour étudier et caractériser les mécanismes nociceptifs et inflammatoires de cette pathologie.

L'objectif de cette étude sera d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques dans un modèle de prostatite induit par la carragénine chez le rat male (évaluation nociceptive).

Les méthodes alternatives, permettant une évaluation nociceptive sont inexistantes. Ainsi, ces limitations rendent incontournables le recours à l'expérimentation animale afin de valider de nouveaux candidats médicaments pour le traitement de la prostatite.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 720 sur 5 ans.

Nous avons établi une stratégie d'expérimentation qui nous permet de mesurer la valeur basale de chaque animal. Ainsi, chaque animal est son propre contrôle. De plus, l'analyse de l'hypersensibilité viscérale est une technique non-invasive qui permet d'observer au cours du temps la réponse nociceptive d'un seul animal, là où l'information devait être obtenue par euthanasie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude. La caractérisation du modèle se faisant ex-vivo (analyse histologique, dosage de médiateurs inflammatoires...), aucun n'animal ne sera utilisé spécifiquement à cette fin.

Notre stratégie permettra donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux.

De plus, les animaux seront hébergés selon les recommandations de la directive européenne avec un enrichissement de leur hébergement (morceau de bois ou tunnel) permettant de les stimuler. Les animaux seront nourris ad libitum et hébergés en groupe ; ils ne seront séparés qu'en cas de comportement agressif. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours.

En accord avec la règle de raffinement, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante.

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

Ce projet incluant des procédures classées sévères subira une évaluation rétrospective par les autorités compétentes.

12011 Différents types de traitements peuvent être utilisés pour traiter un cancer colorectal: la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et les thérapies ciblées. La chirurgie est le traitement principal du cancer du côlon. Elle consiste à enlever la portion du côlon atteinte par la tumeur. Une fois la portion du côlon atteinte enlevée, le chirurgien réalise une anastomose, c'est-à-dire qu'il recoud les deux extrémités du côlon restant. Cette étape de l'intervention permet de reformer le conduit intestinal et de rétablir la continuité digestive. Cependant, il est nécessaire de mettre le côlon au repos pour favoriser sa cicatrisation. Une stomie temporaire est alors pratiquée. On parle aussi de stomie de protection.

On désigne sous le nom de stomie une petite ouverture créée en amont du colon pour évacuer les selles avant que celles-ci n'atteignent le colon. L'intestin est relié au ventre et les selles sont recueillies dans une poche spéciale, collée autour de la stomie. Le terme d'anus artificiel est parfois utilisé. Elle dure en moyenne entre trois et six mois. Une fois le côlon cicatrisé, une nouvelle intervention est programmée pour refermer la stomie et rétablir la continuité intestinale. Cette stomie présente une lourde pour les patients et impose une seconde intervention pour son retrait. C'est pourquoi nous développons un implant temporaire pour la protection des anastomoses colorectales basses. Le but est de protéger l'anastomose par un dispositif interne afin d'éviter les stomies de protection. La protection est assurée par une longue gaine souple qui réalise un by-pass intra colique provisoire. Cette gaine est maintenue en place par un stent entéral partiellement couvert auquel elle est accrochée. Le dispositif est introduit dans le tube digestif par voie trans anale : le stent est largué en amont de l'anastomose. La gaine se déploie dans le colon à travers l'anastomose puis le canal anal et enfin l'orifice anal. L'ancrage du stent est renforcé par un dispositif de vide : un effet de succion est créé par l'application de vide entre une partie de la gaine et le colon dans la

zone centrale du stent. Le vide est apporté par des bouteilles de type « Redon » qui communiquent le vide par un circuit de tube d'aspiration. Après la reprise du transit intestinal, les selles s'évacuent au travers de la gaine sans être en contact avec l'anastomose.

Après la période d'implantation, entre 10 et 14 jours, le dispositif est retiré par colonoscopie sans intervention chirurgicale. En plus de la vérification technique sur banc, les essais pré-cliniques sont nécessaires pour vérifier le bon fonctionnement du dispositif dans des conditions similaires à celles des patients. Cette validation est donc une étape nécessaire pour assurer la sécurité des patients.

Nous réalisons les tests précliniques sur des porcs juvéniles. En effet, l'anatomie et le péristaltisme du colon (ensemble des contractions musculaires permettant la progression des matières fécales dans le colon jusqu'à l'anus) sont similaires à ce qui est observé chez l'homme.

Le nombre minimal d'animaux pour une configuration donnée est typiquement de 6 sans défaut de sécurité pour avoir une bonne indication de bon fonctionnement. Plusieurs configurations seront testées pour optimiser le dispositif et plusieurs séries pourront être nécessaires sur une même configuration en fonction des résultats de la série. Le nombre d'animaux que nous envisageons d'utiliser est donc de 60 pendant un an.

Dans les tests réalisés antérieurement, le dispositif et la chirurgie sont bien supportés par les animaux, toutefois si des signes d'inconfort devaient survenir, une alimentation adaptée et des traitements antalgiques seront mis en place. Pendant la phase post-chirurgicale, les animaux seront hébergés dans des enclos individuels mais ils continueront à cohabiter avec leurs congénères des boxes adjacents.

12012 La barrière hémato-encéphalique (BHE) est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales dans les microvaisseaux cérébraux, limitant les échanges entre le compartiment sanguin et le compartiment parenchymateux. Ainsi, la BHE protège les neurones contre les facteurs présents dans la circulation systémique et maintient l'homéostasie du système nerveux central.

L'altération de la BHE a été décrite dans de nombreuses pathologies telles que les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, sclérose en plaque), ou à la suite d'un accident vasculaire cérébral (AVC) ou encore lors d'infections cérébrales et d'encéphalopathie traumatique chronique.

L'altération de la BHE est facteur déterminant dans la gravité de ces pathologies, puisqu'elle a pour conséquence l'influx dans le cerveau d'agents neurotoxiques dérivés du sang, de pathogènes microbiens et est associée à des réponses inflammatoires et immunitaires, qui peuvent initier et exacerber plusieurs voies de mort neuronale. Jusqu'à présent, aucun traitement visant à protéger l'endothélium vasculaire lors de la survenue de ces différentes pathologies n'est disponible.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet d'un traitement pharmacologique sur la protection et la réparation de l'endothélium vasculaire dans deux modèles différents chez le rat conduisant tous deux à une rupture de la BHE : modèle avec choc osmotique et modèle d'ischémie cérébrale.

Le projet sera réalisé en suivant le principe des 3R (Raffiner, Réduire, Remplacer). Raffiner : les animaux seront hébergés aux normes requises et le milieu sera enrichi. Une stratégie d'anesthésie et d'analgésie sera mise en place avec un suivi quotidien du bien-être animal. Réduire : grâce à l'utilisation au préalable de tests statistiques appropriés, le nombre d'animaux nécessaire pour permettre une puissance des résultats sera réduit au minimum. De plus les mêmes animaux seront utilisés pour une analyse non invasive par IRM, ainsi qu'une analyse histologique après leur mise à mort. Remplacer : le rat est utilisé comme modèle de choix dans la littérature pour étudier les altérations vasculaires et l'AVC ; qui ne peuvent pas être reproduits in vitro.

Le nombre de rats prévu pour cette étude est 330.

12013 Les maladies inflammatoires (MI) chroniques représentent la troisième cause de mortalité dans les pays développés, et la 2ème ligne de dépense pour les systèmes de santé internationaux. Ces maladies parfois très distinctes sur le plan phénotypique (psoriasis, entérocolopathies inflammatoires, vascularites, lupus, sclérose en plaque...) se caractérisent en fait par des traits physiopathologiques communs. A titre d'exemple les facteurs de susceptibilité génétique

(polymorphismes de gènes retrouvés associés aux MI) sont partagés par les MI, et les facteurs immunologiques impliqués dans la genèse des lésions le sont également. Dès lors il n'est pas surprenant de voir que les traitements de ces maladies sont également partagés. Parmi les phénomènes immunologiques impliqués dans la genèse des lésions, une sous-population de lymphocytes occupe une place importante. En effet, ces lymphocytes sont capables de sécréter des cytokines à fort pouvoir inflammatoire au cours du développement et de la progression de ces maladies. La compréhension des mécanismes impliqués dans leur activation, prolifération et migration revêt dès lors une importance toute particulière.

Notre équipe a pu démontrer qu'une molécule, le FASL soluble, était capable de favoriser la migration de lymphocytes pro-inflammatoires au sein des tissus inflammatoires. Dans cette étude nous avons montré dans un modèle murin de lupus que le blocage de cette molécule améliorait les paramètres cliniques et biologiques de la maladie. Plus récemment, dans une étude récemment publiée, nous avons 1/ généré un peptide, le DB550, capable de bloquer in vitro et in vivo (modèle de lupus) le FASL soluble et 2/ identifié des molécules (famille des anti-protease du VIH - ritonavir) capables d'inhiber le FASL soluble.

Nos résultats plus récents et non publiés suggèrent que le FASL soluble pourrait avoir un rôle dans d'autres maladies inflammatoires. En effet nous retrouvons des taux élevés de cette molécule dans le sérum de patients affectés de vascularite, d'entérocolopathie inflammatoire et de sclérodémie systémique.

Afin de valider nos observations chez les patients, il est important d'étudier si des modèles animaux récapitulant les maladies humaines se caractérisent par cette même observation et si cette molécule constitue une cible thérapeutique intéressante. Ainsi, pour les vascularites, nous utiliserons un modèle murin induit de glomérulonéphrite (néphrite néphrotoxique = NTN), une caractéristique des vascularites auto-immunes à ANCA (anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles).

Pour ce faire, les animaux recevront un serum néphrotoxique puis seront traités avec le DB550 ou le ritonavir pour ralentir la glomérulonéphrite induite. Après leur euthanasie nous prélèverons leurs reins pour réaliser une étude histologique et ainsi évaluer la dégradation rénale. Nous récolterons du serum pour y doser l'urée et la créatinine. Nous récolterons également les urines des animaux, avant et après traitement pour évaluer l'évolution de la fonction rénale au cours du temps en dosant l'albumine et la créatinine.

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences, 250 souris sur une période de 3 ans.

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

- Remplacer les modèles animaux :

Des méthodologies de culture cellulaire et de modélisation in vitro ont été implémentées afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux pour répondre à certaines questions spécifiques de ce projet. Mais seul un modèle murin récapitulant les éléments de la physiopathologie des vascularites auto-immunes à ANCA observée chez l'homme, permettra de vérifier l'efficacité thérapeutique et l'absence de toxicité cellulaire des deux molécules utilisées, le DB550 et le ritonavir pour le développement d'essais précliniques chez l'Homme.

- Réduire le nombre d'animaux en expérimentation :

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et avoir le nombre de contrôles internes obligatoires, pour prouver l'efficacité des molécules thérapeutiques utilisées.

- Raffiner:

Afin de respecter la notion de raffinement, et éliminer ou réduire toute douleur, souffrance, angoisse, ou tout dommage durable susceptible d'être infligé aux animaux, leur bien-être et leur souffrance seront pris en compte leur naissance à leur mort et évalués selon les critères de Lloyd et al. (Lab Animal, 1998). Ainsi pour chaque procédure impliquant une douleur supérieure à celle d'une piqûre, les animaux seront anesthésiés.

De plus, chaque cage reçoit un enrichissement du milieu en l'occurrence des nids de « woodwool »

12014 L'accident vasculaire cérébral (AVC), ou ischémie cérébrale, est l'une des premières causes de mortalité et la plus fréquente cause d'handicap non traumatique acquis chez l'adulte. Il est caractérisé par une réduction transitoire ou permanente du débit sanguin cérébral suite à la rupture ou à l'obstruction d'une artère cérébrale. Dans de telles circonstances, l'arrêt de l'apport en oxygène et en glucose initie, au niveau du territoire cérébral concerné, une série complexe d'événements physiopathologiques incluant la mise en place d'une réponse inflammatoire. Bien que cette dernière soit mise en place afin de rétablir l'homéostasie tissulaire, elle semble cependant évoluer vers une forme chronique et participer à l'aggravation des lésions.

La réponse inflammatoire tissulaire est sous contrôle de cellules immunocompétentes résidentes spécifiques de cet environnement tissulaire. Dans le système nerveux central, l'inflammation repose sur l'activation des cellules astrocytaires mais surtout des cellules microgliales, uniques cellules immunocompétentes résidentes du parenchyme cérébral. Ces dernières peuvent revêtir, après activation et selon la nature des signaux environnementaux perçus, un phénotype neuroprotecteur appelé M2-like ou un phénotype neurotoxique appelé M1-like.

En ce qui concerne la réponse inflammatoire post-ischémique, les cellules microgliales adoptent lors de la phase aigüe le phénotype Mi2, puis adoptent progressivement le phénotype neurotoxique Mi1. De précédents travaux ont récemment montré, dans un modèle murin d'ischémie focale permanente, que la transplantation de cellules souches embryonnaires (ES), génétiquement modifiées pour exprimer le neuropeptide PACAP, améliorait la restauration fonctionnelle. Cette dernière semble être corrélée à une modulation de la réponse inflammatoire, et plus précisément, à une réorientation du phénotype microgliale M1-like vers un phénotype neuroprotecteur M2-like. Ainsi il apparaît que la réorientation spécifique des réponses microgliales *in vivo* vers leur phénotype neuroprotecteur Mi2 pourrait permettre d'enrayer certains processus physiopathologiques responsables de la neurodégénérescence, et promouvoir les mécanismes de réparation tissulaire, contribuant ainsi à une amélioration de la restauration fonctionnelle post-ischémique.

Dans ce contexte, nous avons confirmé, dans un premier temps, l'effet direct du PACAP sur le phénotype microgliale en condition normoxique et hypoxique *in vitro*. Nous avons notamment démontré que la présence seule du neuropeptide PACAP dans le milieu, était capable de réorienter le phénotype microgliale en condition normoxique et hypoxique vers le phénotype neuroprotecteur M2-like. Puis, afin de cibler spécifiquement les cellules microgliales *in vivo*, nous avons conjugué le neuropeptide PACAP à des quantum dots (QD), qui, d'après la littérature, permettent de cibler spécifiquement ces cellules. Nous avons également pu confirmer que les QD-PACAP étaient capable d'orienter le phénotype microgliale vers le phénotype Mi2-like. Enfin, afin de confirmer notre hypothèse, nous souhaiterions étudier la restauration fonctionnelle *in vivo* suite à l'injection directe de ces QD-PACAP au niveau de la zone d'infarct. Seul le modèle animal nous permet d'évaluer la récupération fonctionnelle post-ischémique.

Afin de pouvoir comparer avec nos précédents résultats, 52 souris mâles CX3CR1+/GFP seront requises pour mener à bien ce projet. Ce nombre est basé sur le nombre minimal de souris nécessaire pour la validation statistique des résultats obtenus tout en anticipant le nombre d'échec et la mortalité liés au modèle expérimental mis en œuvre. Les animaux seront nourris et abreuvés *ad libitum*, hébergés dans des cages pourvues d'enrichissement en armoire ventilée (atmosphère contrôlée : température et hygrométrie) selon un cycle de 12h jour/nuit. Dans la mesure du possible, les animaux seront au minimum 2 par cage afin de respecter le caractère social des souris. Une ischémie cérébrale obtenue par électrocautérisation de l'artère cérébrale moyenne (ACM) droite sera réalisée 3 jours avant administration des QD-PACAP puis la récupération fonctionnelle des animaux sera évaluée via des tests comportementaux 7 jours post-ischémie. Bien que l'électrocautérisation de l'ACM engendrera durant les premiers jours certains déficits moteurs des membres supérieurs et inférieurs gauches ainsi que des problèmes de mastication liés à la désinsertion du muscle maxillaire durant le protocole chirurgical, l'administration des QD-PACAP devrait réduire rapidement les déficits fonctionnels. Toutes les dispositions seront prises afin de minimiser la souffrance et l'anxiété des animaux. Des anesthésiques seront utilisés au cours de la chirurgie, en combinaison avec des analgésiques injectés en pré- et post-opératoire. De la nourriture ramollie sera placée à même la litière des animaux afin de faciliter leur alimentation. Une

observation ainsi qu'une évaluation pluriquotidienne de l'état des animaux pendant les 72h post-opératoires puis quotidienne jusqu'à l'arrêt de l'expérimentation seront réalisées. Selon la sévérité de la souffrance animale observée, les animaux recevront des antalgiques si souffrance modérée, ou seront euthanasiés en cas de souffrance excessive. Il est à noter que les procédures envisagées ne devraient pas générer de souffrance animale excessive nécessitant l'euthanasie des animaux.

Pour conclure, cette étude permettra une meilleure compréhension de l'influence de la réponse inflammatoire sur la récupération fonctionnelle en vue d'améliorer les traitements post-ischémiques.

12015 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte progressive d'un seul type cellulaire du cerveau : les neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta. Il n'existe pour l'instant aucun traitement capable d'arrêter ou d'inverser durablement l'évolution de cette maladie. Mieux comprendre les raisons premières de la destruction de ces cellules dopaminergiques (ou de leurs dysfonctionnements) apparaît donc comme une clef essentielle qui permettra de progresser dans le domaine des thérapeutiques curatives et préventives de la maladie de Parkinson. À ce titre, disposer à volonté en laboratoire de lignées de cellules dopaminergiques humaines est d'un intérêt majeur. Le but de cette étude sera de développer un modèle de neurones dopaminergiques immortalisés, murins dans un premier temps, puis humains dans un second temps. Des précurseurs neuronaux dopaminergiques obtenus à partir d'embryons murins ou à partir de cellules souches humaines différenciées seront transduits de façon à exprimer un transgène immortalisant. Ces cellules seront ensuite greffées dans la capsule rénale de souris immunodéprimées qui serviront de bioincubateur pour établir des lignées cellulaires stables et reproductibles.

Ce nouveau modèle expérimental constituera un puissant outil pour étudier les mécanismes moléculaires qui contrôlent le développement et le fonctionnement des neurones dopaminergiques dans le cerveau humain. L'obtention de chacune de nos lignées de neurones dopaminergiques nécessite la greffe au total de 42 souris, nombre réduit au minimum pour obtenir une lignée cellulaire avec un taux de réussite élevé. Le nombre total de souris nécessaire à l'obtention de 3 lignées murines et 3 lignées humaines, est estimé à 252, sur une durée de 5 ans. Nous veillerons à prendre toutes les mesures de raffinement pour éviter douleur, et tout type de stress de l'animal pour chacune de nos procédures expérimentales (milieu enrichi, soins adaptés et médication). Enfin, même si nos lignées de cellules nécessitent l'utilisation de souris pour leur obtention, elles représentent un modèle *in vitro* unique et majeur qui va permettre de tester de nombreuses hypothèses scientifiques concernant la physiologie des cellules dopaminergiques humaines. Aujourd'hui l'absence de modèles cellulaires humains pour la maladie de Parkinson et syndromes apparentés nécessite l'utilisation de modèles animaux. Les cellules produites dans ce projet représenteront une véritable solution de remplacement des modèles animaux par des modèles cellulaires pour développer de nouveaux médicaments pour combattre ces pathologies.

12016 Environ 1/3 de la population mondiale souffre d'anémie consécutive à une carence en fer, une maladie génétique ou une maladie chronique. Outre son rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques fondamentaux, le fer assure le transport de l'oxygène en tant que constituant majeur des globules rouges. L'hormone érythroferrone (ERFE) assure l'augmentation de l'apport en fer pour la synthèse de nouveaux globules rouges lors d'une anémie consécutive à une hémorragie, une infection, une inflammation et lors du paludisme. A l'inverse, dans les anémies héréditaires comme la β -thalassémie, une maladie génétique affectant des millions de personnes dans le monde, une augmentation de la production d'ERFE entraîne une absorption excessive de fer particulièrement néfaste pour ces patients. En revanche, rien n'est connu du mécanisme par lequel ERFE agit sur sa cible pour réguler le métabolisme du fer. Le potentiel thérapeutique d'ERFE est énorme car de nombreuses pathologies pourraient bénéficier d'un traitement visant à stimuler ou inhiber ERFE (hémochromatoses, thalassémies, polyarthrite rhumatoïde, maladies chroniques de l'intestin, affections rénale chronique, infections, cancer...). Cependant, nos données suggèrent qu'une deuxième hormone inconnue assure une fonction similaire et son identification est indispensable pour envisager la mise en place de ces stratégies thérapeutiques.

Pour ce faire, nous utiliserons différents modèles de souris de pathologies humaines mis en place au sein de l'institut car la régulation du fer est impossible à modéliser in vitro. Il est pour l'instant impossible de la contrôler chez l'homme car les voies de régulation ne sont pas totalement connues. Les modèles de souris génétiquement modifiés miment les pathologies humaines et sont la seule solution actuelle pour obtenir des données avec une relevance physiologique correcte. Pour atteindre les objectifs de nos études, il est nécessaire d'utiliser des modèles de souris capables de tenir compte de nombreuses voies physiologiques intégrées. Il n'existe pas actuellement des méthodes alternatives à ces études. Le nombre de souris utilisé dans chaque expérience a été réduit au minimum en tenant compte de la variance biologique des résultats obtenus. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés tous les échantillons prélevés sont stockés à -80°C et répertoriés dans une banque de données. Ils peuvent être réutilisés dans des expériences ultérieures, servir de témoins pour de nouvelles expériences ou transmis à d'autres laboratoire de recherche. Les souris sont contrôlées tous les jours, voire deux fois par jour. Les critères suivants sont pris en compte : perte de poids, activité extrême, posture prostrée, aspect (amaigrissement, déshydratation, poils hérissés, salissures et écoulements). Si l'un de ces critères est atteint, l'expérimentation est immédiatement arrêtée et les souris sont euthanasiées. Au total, la réalisation de ce projet nécessite l'étude de 1000 animaux.

12017 La ricine est une protéine d'origine végétale qui est au cœur des efforts dans la lutte contre le risque de bioterrorisme. Parmi les modes de dissémination de cette toxine, la voie aérosol est la plus préoccupante. Toutefois, aucune solution thérapeutique anti-ricine n'a à ce jour été testée et validée en France. Disposer d'une telle validation de contre-mesures constituerait une avancée majeure au regard de la menace terroriste que constitue la ricine pour les populations civiles, de défense, et de sûreté/sécurité.

Le primate non humain (PNH) a été choisi pour ce projet. Il constitue en effet un modèle d'exposition du tractus respiratoire bien maîtrisé car anatomiquement comparable à celui l'homme. Il fournit également une réponse moléculaire, biologique et clinique quantifiable à l'aide d'outils transposables immédiatement chez l'Homme.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 44 animaux nés et élevés en captivité et provenant d'élevages agréés. Afin de réduire ce nombre à un minimum nécessaire compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour l'interprétation des résultats, les animaux seront au préalable exposés à un placebo (groupe contrôle) puis seront ensuite exposés à la toxine. Ces animaux seront répartis dans 2 protocoles. Le premier consiste à finaliser la mise en place d'un modèle macaque opérationnel d'intoxication par la ricine L'intoxication désigne l'état dans lequel se trouve un organisme après ingestion, inhalation ou absorption de toxines. Le second protocole, consiste à utiliser le modèle d'intoxication pour tester l'efficacité thérapeutique de contre-mesures protéiques (anticorps) et/ou chimique.

Les méthodes expérimentales ont été conçues de façon à éviter toute souffrance lors des interventions (prélèvements de sang, intoxication expérimentale) sur les animaux : elles seront réalisées sous anesthésie générale, et les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum pour obtenir des résultats fiables.

Une attention particulière sera apportée à l'hébergement des animaux en groupe. Des critères d'arrêt, basés sur l'observation de signes cliniques d'intoxication, sont prévus afin de prendre en compte les effets éventuels liés à l'intoxication. Dans ce cas, le vétérinaire en charge de l'installation sera sollicité afin de prescrire un traitement approprié. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure de « bien-être animal » de l'établissement.

12018 Le glyphosate est l'un des herbicides les plus largement utilisés dans le monde. Son utilisation extensive fait que sa substance active (SA) et son principal produit de dégradation est très largement retrouvés dans les eaux superficielles et souterraines. Si les propriétés physico-chimiques de la SA sont plutôt en faveur d'une certaine innocuité environnementale, des études récentes ont néanmoins révélé des effets néfastes chez différents organismes. De même, il semblerait que certaines molécules (adjuvants) ajoutées dans les formulations commerciales

gènèrent une toxicité supérieure à la SA seule. Les données disponibles à l'heure actuelle permettant d'évaluer l'innocuité sanitaire et environnementale du glyphosate divisent les experts dans un contexte où le renouvellement de son autorisation se pose au sein de l'Union Européenne.

Le présent projet a pour objectif d'améliorer les connaissances sur l'impact du glyphosate et de ses adjuvants sur l'environnement, la santé et le bien-être des animaux. L'écotoxicité directe et transgénérationnelle du glyphosate seul ou co-formulé sera évaluée sur plusieurs générations de truites arc-en-ciel (TAC). Deux précédentes procédures expérimentales ont été menées en 2017 et 2018 où des géniteurs ont été exposés de manière chronique au pesticide, suivant quatre conditions expérimentales : témoins, SA seule et deux produits phytosanitaires (PP1 et PP2). Ces quatre lots de géniteurs ont engendré quatre générations F1 avec des histoires de vie prénatale différentes au mois de novembre 2018. Il est désormais question d'évaluer l'état de santé des générations F1 nées en 2018 face à différents stress environnementaux, tels qu'une exposition chimique aiguë ou chronique ou encore une maladie virale. Pour ce faire, trois nouvelles expérimentations seront menées.

Tout d'abord, 2400 alevins (âgés de 4 mois) issus des géniteurs contaminés à 1 µg/L de glyphosate pendant 10 mois seront infectés par deux souches virales de référence afin de mesurer leur potentiel global de défense. Puis, 1360 alevins (âgés de 5-6 mois) issus des mêmes géniteurs que précédemment seront contaminés à 500 µg/L de glyphosate pendant 4 jours puis éprouvés à une infection virale expérimentale afin d'évaluer l'impact d'une exposition aiguë sur cette F1. Enfin, 5000 alevins issus des mêmes géniteurs que précédemment seront contaminés à 1 µg/L de glyphosate pendant 5 mois environ. Parmi eux, 2400 seront éprouvés à une infection virale expérimentale afin d'évaluer l'impact de cette exposition chronique et 250 serviront de géniteurs pour générer une génération F2. Au total, 8760 animaux seront donc utilisés.

Ces trois procédures expérimentales seront menées dans le respect de la règle des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique et le raffinement dans la gestion des lots de poissons. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux (volume d'eau adapté avec une oxygénation suffisante, rythme jour/nuit naturel, présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche, alimentation adaptée à leur stade de vie) et à appliquer des mesures pour réduire la douleur des individus pendant les procédures expérimentales. En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable, l'utilisation de la truite arc-en-ciel étant nécessaire puisque c'est une espèce-modèle en écotoxicologie et qu'aucune méthode alternative n'a encore été développée pour réaliser ces travaux. Enfin, des prélèvements de sang et d'organes cibles (branchies, foie, rate) seront effectués pour suivre des biomarqueurs d'exposition et d'effet. Ainsi, la bioconcentration en molécules chimiques, les activités enzymatiques des défenses antioxydantes ou encore l'expression de gènes d'intérêt liés à la réponse immunitaire pourront être étudiés.

12019 La cystite interstitielle (CI), aussi appelée syndrome de la vessie douloureuse, est une affection urologique très invalidante. Maladie chronique inflammatoire mais non infectieuse, la CI touche principalement les femmes. Elle provoque d'intenses douleurs dans le bas ventre ainsi que des mictions fréquentes et urgentes de jour comme de nuit. Les traitements sont empiriques et non universels avec pour but de diminuer l'intensité des symptômes et leur impact sur la qualité de vie des patients.

Aujourd'hui, les causes précises et la physiopathologie de la CI ne sont pas connues, cependant plusieurs hypothèses sont évoquées, notamment que la CI pourrait avoir une composante auto-immune. En effet, l'inflammation de la vessie pourrait être due à la présence d'anticorps nocifs s'attaquant à la paroi de la vessie (réaction auto-immune). De tels anticorps ont été retrouvés chez certaines personnes atteintes de cystite interstitielle.

Expérimentalement, des modèles de cystite auto-immune induits par l'injection d'une protéine spécifique de la vessie sont développés. Ces modèles regroupent les 3 symptômes caractéristiques

de la CI (douleur, inflammation et dysfonction vésicale) et représentent donc un modèle de choix pour tester des candidats médicaments pour le traitement de la CI.

L'objectif de cette étude sera dans un premier temps de mettre au point un modèle de cystite auto-immune et, dans un deuxième temps, d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques dans ce modèle (évaluation nociceptive et / ou de la fonction vésicale).

Les méthodes alternatives, permettant une évaluation nociceptive ou de la fonction vésicale, sont inexistantes. Ainsi, ces limitations rendent incontournables le recours à l'expérimentation animale afin de valider de nouveaux candidats médicaments pour le traitement de la CI.

Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 1020 rats et 576 souris en raison de 10-12 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Le détail du nombre d'animaux sera présenté pour chaque procédure.

Nous avons établi une stratégie d'expérimentation qui nous permet de mesurer la valeur basale de chaque animal. Ainsi, chaque animal est son propre contrôle. De plus, l'évaluation nociceptive ; analyse de l'hypersensibilité viscérale par test manuel de Von Frey et, l'évaluation de la fonction vésicale ; analyse du profil mictionnel par cage à métabolisme s'effectue grâce à des techniques non-invasives. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet d'observer au cours du temps la réponse nociceptive ou mictionnelle d'un seul animal, là où l'information devait être obtenue par euthanasie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude. Notre stratégie permettra donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux.

Afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, différents types d'enrichissement (carré de coton, bâtons à ronger, tunnel) pourront être ajoutés aux animaux, tels que : afin de les stimuler (nidation, rongement, jeux)

-Des Nestlets (carré de coton pur), permettant aux souris de faire une nidation (uniquement utilisé chez la souris) ;

-Des Aspen brick (bâtons à ronger) permettant aux animaux d'assouvir leurs besoins de rongement et limitant les querelles entre les mâles.

-Des igloos ou des tunnels, permettant le jeu et le repos des animaux.

De plus, les interventions chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle par l'utilisation de tapis chauffant thermostaté.

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

De plus, ce projet ayant des procédures classées sévères une évaluation rétrospective sera nécessaire. Nous avons également établi des critères qui mettront fin à l'expérimentation si nécessaire :

- altérations des fonctions normales (impossibilité d'uriner, de s'alimenter...)
- comportements atypiques (vocalisation, prostration...)
- une perte de poids >20% du poids initial
- Détection/présence d'une anomalie (plaie, pilo-érection...),
- une réponse exacerbée aux filaments de Von Frey

12020 En France, environ 1700 nouveaux cas de cancers pédiatriques sont diagnostiqués chaque année. Parmi ces cancers, les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) sont les plus fréquentes. Les progrès diagnostiques et thérapeutiques permettent, aujourd'hui, d'améliorer la survie des enfants (89,8%) et des adolescents (62,8%) atteints de cancer. Selon le traitement des LAL, le patient peut se voir proposer une greffe de cellules souches hématopoïétiques (allo ou autogreffe) précédée d'une chimiothérapie à haute dose visant à détruire un maximum de cellules cancéreuses et créant une immunosuppression suffisamment importante pour éviter le rejet de la greffe. Ce conditionnement avant greffe, connu pour sa toxicité sur les gonades et les cellules germinales souches, affecte la fertilité de ces jeunes patients.

Chez les hommes pubères, il est possible de préserver la fertilité par congélation de spermatozoïdes afin de les utiliser ultérieurement en assistance médicale à la procréation. Pour les garçons pré-pubères ne produisant pas de spermatozoïdes, une procédure de congélation du tissu testiculaire peut être envisagée avant traitement pour allo ou autogreffe. Ce tissu testiculaire prépubère, dont les cellules germinales sont présentes uniquement au stade spermatogonies, pourra être décongelé en vue de produire des spermatozoïdes soit par spermatogenèse in vitro, soit par greffe de tissu testiculaire ou transplantation de cellules germinales chez les patients guéris mais devenus stériles. Cependant, chez les patients présentant une leucémie aigüe, une localisation testiculaire des cellules tumorales est observée dans 30% des cas. La greffe tissulaire pouvant entraîner la réintroduction de cellules cancéreuses, l'approche de maturation in vitro est la meilleure indication pour restaurer la fertilité des patients guéris.

La mise en place de différents protocoles de congélation (congélation lente contrôlée et vitrification sur surface solide) du tissu testiculaire prépubère chez la souris a montré la possibilité d'obtenir une spermatogenèse complète in vitro à partir de tissu testiculaire frais et décongelé. La spermatogenèse in vitro par culture organotypique en interphase gaz-liquide permet de produire des spermatozoïdes féconds dont la qualité nucléaire est comparable à celle observée in vivo.

De nos jours, chez la majorité des patients atteints de LAL, la conservation du tissu testiculaire est proposée uniquement avant le traitement pour allo ou autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Ce traitement est considéré comme très gonadotoxique. Cependant, la majorité des patients ont reçu avant la biopsie testiculaire, des cures de polychimiothérapie pouvant potentiellement être toxique pour la fertilité. A ce jour, aucune étude n'a encore évalué l'impact des polychimiothérapies sur la capacité des cellules germinales souches à maturer in vitro. Avant d'envisager une application clinique, il apparaît donc indispensable d'évaluer, chez un modèle animal, l'impact de ces traitements sur l'intégrité du tissu testiculaire, sur la capacité des spermatogonies à se différencier in vitro et sur la qualité des gamètes produits. Au cours de ce projet, nous effectuerons une étude pilote chez des souris pré-pubères afin de déterminer le traitement de chimiothérapie à injecter pour mimer au mieux celui des LAL chez l'homme. Une fois le traitement déterminé, nous évaluerons (i) les dommages au niveau du tissu testiculaire, (ii) les conditions de cultures les plus adaptées pour la progression de la spermatogenèse et (iii) les altérations nucléaires des spermatozoïdes générés in vitro à partir de tissus testiculaires exposés ou non aux traitements et mis en culture directement après prélèvement, congélation lente ou vitrification. Il est possible que la chimiothérapie entraîne des altérations importantes de la spermatogenèse, empêchant la production de spermatozoïdes in vitro. Nous mettrons alors en place un modèle murin traité par chimiothérapie et molécule chimioprotectrice et déterminerons la dose nécessaire permettant de protéger le tissu testiculaire afin d'obtenir une maturation in vitro.

Notre projet se déroulera dans le respect des 3R : nous veillerons à limiter le stress et assurer le bien-être des animaux en optimisant les conditions d'hébergement par la présence d'enrichissement dans les cages et en laissant les souriceaux auprès de leur mère afin de ne pas perturber leur développement. Une surveillance quotidienne permettra de détecter tout changement du comportement maternel et des souriceaux pouvant traduire un mal-être physique ou un stress mental chez les animaux traités. Nous réduirons à son minimum le nombre de souris utilisées pour chaque procédure, tout en ayant des résultats significatifs. Au cours de cette étude, 1215 souris CD-1 seront utilisées.

12021 Nous déterminerons le rôle de métabolites issus de la flore microbienne intestinale sur la régulation de l'équilibre glycémique et du poids corporel. Des métabolites dérivés de la flore intestinale ont été associés au diabète et à l'obésité chez l'Homme et dans des modèles expérimentaux chez le rat et la souris par analyse de données de métabolomiques. Nous testerons l'impact d'une supplémentation chronique de ces métabolites issus de la flore microbienne intestinale sur la régulation de l'homéostasie glucidique chez le rat adulte à partir de 2 mois in utero et l'effet sur la descendance durant les 8 semaines après la naissance. La supplémentation s'effectuera in vivo par implantation sous cutanée d'une pompe osmotique, qui permet de libérer une solution contenant un métabolite d'intérêt de manière chronique (6 semaines). Concernant la règle des 3R, le projet a

été initialement entrepris in vitro sur des lignées cellulaires. Toutefois le métabolisme glucidique est régulé de façon physiologique par un ensemble de tissus producteurs et cibles de l'insuline, qui rend indispensable des explorations in vivo chez l'animal entier. La réduction est prise en compte, n=8 par métabolite testé est le n minimum pour avoir des résultats fiables et fins pour le dosage de sécrétion d'insuline effectué par ELISA. Nous passerons le plus de métabolites en parallèle pour réduire le nombre d'animaux des groupes contrôles. En ce qui concerne le raffinement, l'utilisation de pompes osmotiques remplace les injections i.p. ou sous cutanées quotidiennes et réduit donc le stress que représente la contention nécessaire aux injections sur des périodes prolongées. Le volume libéré par les pompes est beaucoup plus faible que lors d'une injection, puisqu'il diffuse au cours de la journée, et la pompe contient un volume nécessaire pour un traitement chronique sur 6 semaines. Au moindre signe de souffrance, l'expérimentation sera arrêtée. Nous ne multiplierons pas les procédures sur ces animaux. Nous utiliserons pour tous nos métabolites testés 264 rats GK.

12022 La thérapie génique consiste à introduire dans une cellule malade une copie normale d'un gène afin de corriger ou ralentir la progression d'une maladie héréditaire ou acquise. Les vecteurs recombinants dérivés des Virus Adéno-Associés (AAV) sont des vecteurs de choix pour la thérapie génique car ils assurent un transfert de gène thérapeutique sûr et efficace dans différents tissus et organes.

L'objectif du projet (Muscle AAV) est d'associer la chimie et la virologie pour développer des vecteurs AAV chimiquement modifiés afin d'améliorer leur action thérapeutique dans le cadre du traitement des dystrophies musculaires. Les AAV sont des produits thérapeutiques performants mais des essais précliniques et cliniques ont montré des limites à leur emploi : utilisation nécessaire de fortes doses et transduction non ciblées de certains tissus. Les vecteurs modifiés chimiquement sont une nouvelle génération de vecteurs AAV développés dans le but d'obtenir un ciblage optimal du tissu à traiter, un index thérapeutique augmenté et une biodistribution restreinte. Ceci sera rendu possible par couplage covalent, sur des acides aminés de la capsid de l'AAV, d'un ligand spécifique d'une cible et pouvant être de natures diverses (polymères, peptides, sucres ou lipides). Dans ce projet, nous utiliserons des sucres et des peptides pour cibler les cellules musculaires lisses, squelettiques et cardiaques pour le traitement de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). La DMD est une maladie génétique liée au chromosome X affectant environ 1 garçon sur 5000 à la naissance. Elle est due à des mutations dans le gène *dmd* codant pour la protéine Dystrophine, une protéine essentielle au fonctionnement et maintien de l'intégrité des fibres musculaires. Chez les patients DMD, l'absence de Dystrophine dans l'intégralité des muscles (squelettiques, lisses, diaphragme et cœur) provoque leur dégénérescence progressive, une faiblesse musculaire, la perte de la marche avant l'âge de 15 ans, l'apparition de déficiences respiratoires et cardiaque, et finalement une mort prématurée des patients. Aucun traitement curatif n'est disponible à ce jour. La thérapie génique, qui vise à corriger ou remplacer le gène *dmd* est aujourd'hui une approche prometteuse pour le traitement de la DMD.

Pour l'évaluation de notre approche thérapeutique, des vecteurs AAV9 porteurs d'un transgène murin codant pour la μ Dystrophine (AAV9-mMD1) seront fonctionnalisés par une molécule chimique portant à son extrémité une fonction de reconnaissance spécifique du tissu ciblé. Pour potentialiser le ciblage des cellules musculaires nous avons choisi de mener en parallèle le couplage chimique de deux types de ligands sur les vecteurs AAV9 :

- 1) Les dérivés du mannose et du mannose-6-phosphate, dont les récepteurs sont fortement exprimés à la surface des cellules musculaires,
- 2) Trois types de peptides ciblant les cellules musculaires.

Le transgène μ Dystrophine MD1 est une copie miniaturisée du gène de la dystrophine humaine, capable de remplacer le gène déficient en produisant une protéine « μ Dystrophine » fonctionnelle.

Groupes expérimentaux :

Un maximum de 84 animaux sera inclus dans ce projet, répartis en 12 groupes de rats DMDmdx (5 ligands étant testés avec 2 niveaux de modification chacun + un groupe témoin injecté avec le tampon de formulation + un groupe témoin injecté avec le vecteur non modifié). Les différents

groupes expérimentaux seront injectés de façon séquentielle sur une période de 6 mois avec les vecteurs AAV9-Mannose, AAV9-Mannose-6-phosphate, puis les vecteurs AAV9-peptide1, AAV9-peptide2, AAV9-peptide3. Les vecteurs seront injectés par voie intraveineuse au niveau de la veine caudale aux animaux à l'âge de 4 semaines, à la dose de $1E13$ vg/kg.

En cours d'étude, des prélèvements sanguins seront réalisés pour biochimie sanguine et analyse de la réponse humorale anti-mMD1. Les animaux seront sacrifiés 2 mois après injection afin de réaliser la quantification des génomes viraux, du messenger mMD1 dans les différents tissus mais aussi l'analyse de l'expression de la protéine mMD1. Les résultats obtenus détermineront si la (les) modification(s) chimique(s) apportés sur l'AAV9-MD1 permettent de réduire sa biodistribution et d'augmenter son index thérapeutique.

Dans le respect de la règle des 3R, nous REDUIRONS le nombre d'animaux à un maximum de 7 rats par groupe. Ce nombre est basé sur notre expérience précédente de protocoles de thérapie génique lors desquels nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles dans des groupes de cette taille. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en terme d'animaux à inclure. Selon les résultats, la totalité des rats ne sera peut-être pas utilisée dans chaque groupe (<7 rats par groupe), participant ainsi à la REDUCTION. Une analyse statistique sera réalisée, en utilisant des tests non paramétriques de type Kruskal-Wallis.

Le REMPLACEMENT d'animaux ne sera pas possible dans cette étude, car il n'existe pas aujourd'hui de méthode alternative pour tester l'effet d'un traitement de thérapie génique in vivo. L'animal est le seul organisme vivant permettant d'étudier l'impact d'un transfert de gène dans différents types cellulaires (différents organes) et sur son phénotype, en lien avec le mode d'administration utilisé et la dose administrée.

Malgré tout, nous RAFFINERONS cette étude par un hébergement des animaux selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en place en fonction des procédures expérimentales : les injections IV de vecteurs seront réalisées sous anesthésie (Etomidate (Hypnomidate®) en IP), précédée d'une prémédication analgésique (Buprénorphine (Véteergésic®) en SC). Les prélèvements sanguins pré-injection seront effectués à l'occasion de cette anesthésie sur les animaux maintenus à température optimale à l'aide de tapis chauffants disposés sur la table d'intervention.

L'évolution de la maladie en elle-même pouvant entraîner de la souffrance chez les rats DMDmdx, l'état général de chaque animal sera surveillé de façon biquotidienne par le personnel animalier pour estimer une gêne ou douleur liées à l'expression clinique de la maladie. Ces observations seront fournies à un vétérinaire.

12023 L'objectif de ce projet est de mieux caractériser l'effet de l'oxaliplatine sur l'audition. L'oxaliplatine est un sel de platine de troisième génération utilisé dans le cadre du traitement du cancer colorectal. Cette molécule entraîne de nombreux effets indésirables, notamment une neuropathie périphérique aigue ou chronique. Dans l'oreille interne la cochlée est l'organe permettant de coder les sons. Les cellules sensorielles de l'organe de Corti, situé dans la cochlée, transforme le signal sonore en signal électrique et le transmette au ganglion spiral dont les axones se regroupent pour former le nerf cochléaire. Le message nerveux est transmis par ce nerf et remonte jusqu'au cortex auditif. Nous soupçonnons un effet neurotoxique de l'oxaliplatine sur le nerf auditif. En effet, l'oxaliplatine entraîne une neuropathie périphérique aigue ou chronique qui pourrait également toucher le nerf auditif. De plus, des données cliniques suggèrent que certains patients ayant reçu un traitement d'oxaliplatine ont montré une ototoxicité. Celle-ci était parfois subtile et difficile à détecter, en effet, les patients présentaient un audiogramme normal mais des troubles d'intelligibilité dans le bruit ce qui fait penser à une neuropathie. Il a également été démontré qu'un traitement d'oxaliplatine sur des organes de Corti en culture induisait une dégénérescence des cellules sensorielles de la cochlée. L'étude et la meilleure caractérisation de l'effet de ce médicament chez l'animal sont une nécessité pour envisager par la suite une meilleure prise en charge des patients traités. Pour cela, le traitement de souris CBA/J selon la même procédure qu'en clinique nous permettrait de disposer d'un modèle animal stable représentant la pathologie. En effet, la souris CBA/J possède un système

auditif très proche de celui de l'homme ainsi qu'une audition stable dans le temps. Cette étude de l'audition ne peut se faire que sur animal vivant. Nous utiliserons deux groupes de 30 animaux (un groupe contrôle et un groupe de souris traitées), soit 60 animaux. Nous utilisons le minimum d'animaux possibles pour avoir des résultats significatifs et prévoir d'éventuelles pertes (présence d'otites d'oreille moyenne qui entraînent une baisse d'audition). Pour évaluer l'audition, nous réalisons des tests fonctionnels sur animal anesthésié. Les tests sont non invasifs et seulement réalisés par l'insertion d'une sonde dans l'oreille et d'électrodes sous la peau. Dès les premiers signes de réveil de l'animal, l'ensemble du matériel est retiré. Tous les animaux bénéficieront d'un suivi quotidien et tout signe de souffrance entraînera l'écartement de l'animal concerné de l'étude.

12024 La principale voie d'élimination du cholestérol par l'organisme se fait par la bile soit directement sous forme de cholestérol soit après transformation de ce dernier en acides biliaires. Un déséquilibre de la composition de la bile secondaire lié à une augmentation du contenu en cholestérol ou à une baisse de celui des phospholipides peut initier la formation de calculs biliaires. Cette maladie très douloureuse et coûteuse est assez fréquente dans les pays occidentaux. Sa prévalence augmente chez les diabétiques et les personnes en surpoids/obèses. Actuellement, les différents traitements consistent soit en l'ablation de la vésicule biliaire ou soit à prendre des médicaments pour tenter de dissoudre les cristaux de cholestérol. Parmi ces traitements figurent l'acide ursodésoxycholique (UDCA), un acide biliaire naturellement présent en faible quantité dans la bile humaine.

Lors d'une étude précédente au laboratoire, nous avons mis en évidence que les souris nourries avec un régime hyperlipidique et recevant de l'extrait liquide de spiruline (ELS) dans l'eau de boisson présentent une augmentation significative de la concentration en UDCA dans leur bile comparée aux souris sous régime hyperlipidique seul. L'ELS est riche notamment en phycocyanine (C-PC), une molécule anti-oxydante. De nombreuses études ont montré des effets physiologiques bénéfiques de la spiruline sur le syndrome métabolique (dyslipidémie, surpoids...), mais aucune étude n'a encore été réalisée pour rechercher les effets de cette bactérie photosynthétique ou de ses composants sur la fonction biliaire.

Dans le présent projet, notre objectif est de mettre en évidence une éventuelle protection de l'ELS sur le développement de calculs biliaires chez les 2 sexes. Pour vérifier l'hypothèse que les effets de l'ELS sont liés à la C-PC, nous réaliserons 2 groupes supplémentés en C-PC pour les femelles et les mâles. Puis, nous investiguerons les mécanismes potentiels sous-jacents (Aspects macro- et microscopiques de la vésicule biliaire, composition des acides biliaires). Ce projet sera réalisé chez la souris C57BL/6 nourrie avec un régime occidental lithogène supplémenté ou non en ELS ou en C-PC dans l'eau de boisson. 60 souris seront au total nécessaires pour ce projet.

La règle des 3 R sera respectée :

Réduction : le nombre de souris a été réduit au minimum pour permettre une bonne évaluation statistique d'une intervention nutritionnelle entre six groupes de souris.

Remplacement : seule une étude in vivo, c'est-à-dire incluant la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu lors du développement de lithiases et suite à la consommation orale d'un produit, peut permettre d'atteindre les objectifs de ce projet.

Raffinement : les souris seront surveillées quotidiennement. Dans le cas de toute modification physique ou comportementale, la surveillance sera accentuée et les souris seront soignées et/ou placées sous antidouleurs afin de minimiser toute souffrance, détresse ou inconfort. Enfin, si l'animal ne parvenait pas à se rétablir, la mise à mort serait envisagée si un des points limites est atteint

12025 L'accident vasculaire cérébral (AVC) entraîne une diminution de la force musculaire, due à la lésion cérébrale, et une immobilisation du membre supérieur replié sur la poitrine, due à l'alitement. Cette immobilisation précoce engendre une augmentation du réflexe à l'étirement amplifiant à son tour l'immobilisation de ces muscles. Nous pensons que ce cercle vicieux entretient une véritable maladie musculaire que nous nommons myopathie spastique.

L'objectif de ce projet est de déterminer l'évolution au cours du temps des propriétés mécaniques et structurelles du muscle squelettique dans le cadre de la myopathie spastique post-AVC à partir d'un modèle de rat. Ce modèle est le rat Wistar de 8 semaines ayant subi un AVC par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAo) et/ou une immobilisation totale d'une patte avant en position rétractée sur la poitrine. Deux durées d'immobilisation seront comparées afin d'évaluer les changements au cours du temps : 14 jours et 28 jours.

Ce projet fait suite à un sujet de recherche effectué dans notre laboratoire, pour lequel les interventions étaient similaires, en y ajoutant un paramètre de variabilité temporelle afin de suivre les évolutions structurelles et mécaniques du tissu musculaire dans leurs décours temporels.

Dans cette étude des essais mécaniques aux échelles microscopique et macroscopique seront effectués sur des échantillons musculaires de rats sains et pathologiques (ayant eu une MCAo et /ou une immobilisation). Une évaluation des aptitudes motrices de l'animal sera de plus menée à travers deux tests moteurs non douloureux (décrits plus loin dans le document). Une corrélation sera également réalisée entre les propriétés mécaniques et les changements des densités des constituants microstructuraux (collagène, différents type de fibres musculaires...) du tissu musculaire quantifiés à partir de coupes histologiques.

Ce projet permettra ainsi de mieux caractériser sur le plan histologique et mécanique cette pathologie et son décours temporel, afin d'entamer une recherche multidisciplinaire sur l'homme et dans un deuxième temps d'envisager de futures études permettant l'amélioration des thérapies existantes.

Il n'existe actuellement pas de modèle in vitro ou in silico permettant de déterminer l'évolution des propriétés mécaniques et structurelles du muscle squelettique atteint de myopathie spastique. Les modèles animaux sont donc essentiels et ne peuvent donc être remplacés.

Afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, le nombre optimal a été calculé statistiquement et en tenant compte du taux de mortalité des rats dû à l'expérimentation. Nous estimons le nombre nécessaire de rat à 64 se répartissant entre 12 rats sains, 20 rats ayant eu une MCAo, 12 rats ayant eu une patte immobilisée et 20 rats ayant eu une MCAo et une patte immobilisée. Pour chacun des groupes, la procédure sera maintenue 14 jours pour la moitié des rats, et 28 jours pour l'autre moitié (calculs détaillés plus loin dans le document). Pendant la phase de chirurgie vasculaire, les animaux sont anesthésiés par un mélange provoquant à la fois une immobilité, une inconscience et une analgésie suffisante pour une intervention chirurgicale (relativement légère) du type pratiqué. Dans notre expérience, un inconfort post-chirurgical ne se manifeste jamais de manière flagrante.

Un examen clinique quotidien à la recherche d'une diminution de la consommation d'eau ou de nourriture, d'une perte de poids, d'une prostration, ou encore d'une hypo-réactivité à la stimulation sera systématiquement mené. Le point limite menant à une euthanasie est fixé à une perte de poids de 20% ou une perte de poids ininterrompue pendant plus de 5 jours

12026 *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est une bactérie responsable d'infection pulmonaire grave chez les patients atteints de mucoviscidose et chez les patients en réanimation. Cette bactérie, au gré de successives antibiothérapies, devient résistante à tous les antibiotiques habituellement utilisés. Aussi il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques aux antibiotiques comme les probiotiques. Les probiotiques sont des microorganismes qui, administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte.

Lors d'une étude précédente, l'analyse du microbiote respiratoire de patients atteints de mucoviscidose a permis de mettre en évidence un genre bactérien particulier : *Porphyromonas*. Ce genre bactérien, et plus particulièrement *Porphyromonas catoniae* (PC), semble être prédictif de l'infection à PA. Il a été montré chez ces patients, que ceux qui avaient moins de *Porphyromonas* dans les poumons, avaient plus de risque de se coloniser à PA. Par la suite, il a également été montré que la quantité de PC pulmonaire venait à diminuer, voire disparaître, préalablement à la colonisation à PA alors que PC restait stable chez les patients non colonisés. La question que nous nous posons aujourd'hui est de savoir si PC possède également une activité probiotique vis-à-vis de l'infection à PA.

Pour cela, l'étude proposée se déroulera de la manière suivante : les souris recevront une première instillation par voie intranasale de PC ou de sérum physiologique additionné de L-cystéine (acide aminé permettant la réduction d'oxygène). Cette instillation est préventive à l'infection à PA également administré de manière intranasale 18 heures plus tard.

Nous utiliserons 84 souris afin de mener à bien cette expérimentation.

La quantité résiduelle de PA sera analysée par culture bactérienne, sur milieu en boîte de Pétri, de manière à pouvoir comptabiliser le nombre de bactéries vivantes et cultivables restantes dans le poumon aux différents temps post-infection (6H, 24H et 48).

L'objectif est d'observer un potentiel effet probiotique de PC vis-à-vis de PA et la persistance de PC dans le poumon.

L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement. En effet une seule espèce de *Porphyromonas* a été sélectionnée grâce aux analyses précédentes réalisées dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'anxiété des animaux (anesthésie préalable des animaux avant toutes procédures expérimentales ainsi que l'utilisation de lampes chauffantes) (principe de raffinement).

12027 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont de manière prédominante d'origine ischémique. L'AVC représente la troisième cause de mortalité pour les hommes et la première pour les femmes. Cette maladie représente aussi la première cause d'handicap acquis chez l'adulte. L'hypertension artérielle est le plus important facteur de risque de survenue de l'AVC. Ce facteur de risque est aussi dit aggravant car sa présence augmente le volume d'infarctus. Ainsi, différents comités d'experts ont fortement recommandé l'intégration de ce facteur de risque dans les études précliniques.

Malgré les efforts et les progrès scientifiques ces dernières années dans la compréhension de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques, l'efficacité des traitements thrombolytiques reste discutée et celle des traitements pharmacologiques efficaces inexistante en clinique. En effet, l'efficacité et la marge thérapeutique des traitements pharmacologiques de cette maladie restent considérablement insatisfaisantes. Il est ainsi très important de poursuivre des études pré-cliniques visant à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les AVC.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet d'une intervention thérapeutique sur le volume de la lésion cérébrale mais aussi sur la récupération fonctionnelle à la suite d'une ischémie cérébrale chez le rat. Cette intervention consiste en une stratégie thérapeutique cellulaire (cellules de la moelle osseuse) combinée à un traitement moléculaire, injectés par voie intra-artérielle après l'induction d'une ischémie cérébrale.

Il n'existe pour l'instant aucun modèle *in vitro* permettant de mimer dans sa complexité la physiopathologie de l'AVC. De plus, l'utilisation d'animaux permet d'avoir un modèle se rapprochant de l'humain et de déterminer ainsi la stratégie à suivre pour le traitement de l'AVC ischémique.

Le rat est l'espèce animale qui a été la plus étudiée dans le domaine de l'ischémie cérébrale. De plus, l'anatomie et la physiologie de la circulation cérébrale sanguine du rat sont bien connues et, par ses grands traits, semblables à celles de l'Homme. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature rend cette espèce particulièrement intéressante pour l'étude de l'ischémie cérébrale. De plus, de nombreux modèles de rats hypertendus existent et peuvent ainsi être utilisés pour étudier l'effet d'une nouvelle stratégie thérapeutique en prenant en compte ce facteur. Ainsi, cette étude sera réalisée chez le rat.

Ce projet comporte un total de 16 groupes de 14 rats chacun, 90 animaux supplémentaires pour des études *ex vivo*, et 30 animaux sont nécessaires à l'extraction des cellules souches. Ainsi, et sachant qu'une mortalité de l'ordre de 20% survient suite aux procédures chirurgicales induisant l'ischémie cérébrale, un total de 344 rats sera nécessaire pour une analyse statistique à la fin du

protocole. Cette estimation est basée sur nos études antérieures utilisant le même modèle d'ischémie cérébrale.

Cette étude comprend 3 volets:

1- Étude de l'effet-dose d'une injection intra-artérielle du traitement moléculaire (nom confidentiel) sur les dommages cérébraux d'origine ischémique chez des rats normotendus (qui ne souffrent pas d'hypertension artérielle).

2- Détermination de l'effet d'une injection intra-artérielle du traitement combiné : cellulaire (cellules souches mésoenchymateuses hétérologues ou de cellules mononucléaires autologues issues de la moelle osseuse) et moléculaire sur les dommages cérébraux et les déficits neurologiques d'origine ischémique chez des rats normotendus (qui ne souffrent pas d'hypertension artérielle).

3- Analyse de l'effet du traitement combiné (cellulaire et moléculaire) chez des rats hypertendus soumis à une ischémie cérébrale.

Toutes les approches et les procédures utilisées dans ces études sont en parfaite adéquation avec la réduction au minimum du nombre d'animaux. En effet, l'estimation du nombre d'animaux par groupe est basée sur les données de nos études antérieures chez le rat et la réalisation d'une analyse de puissance statistique. De plus, nous utilisons des méthodes d'investigation non invasives (tests comportementaux et imagerie IRM) permettant de suivre le même animal à différents temps. Parallèlement, toutes les interventions (à part les tests comportementaux) sont réalisées sous anesthésie adéquate avec une couverture analgésique quand c'est nécessaire.

Comme décrit ci-dessus, le projet sera réalisé en suivant le principe des 3R (Raffiner, Réduire, Remplacer).

12028 Les syndromes myélodysplasiques sont des maladies touchant la moelle osseuse et sont responsables d'un manque de cellules du sang. Elles peuvent évoluer et se transformer en leucémie aiguë myéloïde. Le manque de globules rouges (anémie) représente la complication majeure des SMD nécessitant des transfusions de globules rouges. Les patients atteints de myélodysplasies et polytransfusés ont une survie altérée. Nous pensons que les vésicules extracellulaires présentes dans les poches de transfusion de globules rouges pourraient influencer l'évolution de la maladie vers la leucémie aiguë. Ces vésicules permettent l'échange de molécules actives et pourraient réguler l'expression de gènes impliqués dans le processus d'évolution vers la leucémie. Nous proposons d'évaluer l'effet des vésicules extracellulaires in vivo sur l'hématopoïèse des patients atteints de myélodysplasies, dans un modèle de souris greffées avec des cellules souches humaines.

Il est impossible, à l'heure actuelle, de reproduire de manière in vitro une hématopoïèse d'un syndrome myélodysplasique avec tous ses composants pour étudier l'effet des vésicules extracellulaires provenant des poches de transfusion de globules rouges sur l'évolution des SMD. Par ailleurs, aucun modèle mathématique ou informatique ne permet actuellement d'évaluer également cette réponse.

L'ensemble de ces procédures pouvant s'accompagner d'une douleur/angoisse modérée, tous les efforts seront entrepris pour réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ressentie par les animaux. C'est pourquoi nous surveillerons l'état de santé des animaux tout au long des expériences afin de pouvoir intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de douleur, de souffrance ou d'angoisse. La greffe des cellules souches humaines sera réalisée sous anesthésie générale par utilisation de kétamine et de xylazine. De plus, le nombre d'animaux nécessaire à cette étude a été réduit au minimum, sur la base des besoins imposés par les tests statistiques que nous utiliserons. De fait, un nombre total de 50 souris sera nécessaire. Cette étude nous permettra d'évaluer l'impact des vésicules extracellulaires provenant des poches de transfusion de globules rouges sur l'évolution en leucémie aiguë des syndromes myélodysplasiques.

12029 L'insuffisance cardiaque chronique (ICC) se définit par l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin, alors insatisfaisant pour satisfaire les besoins de l'organisme, dans un premier temps à

l'effort, puis au repos. L'ICC est un problème de santé majeur touchant entre 0.5 et 1 million de personnes en France et dont la prévalence devrait augmenter du fait du vieillissement de la population. Il faut souligner que l'ICC n'est pas uniquement associée à une morbi-mortalité important, et ceci malgré des avancées des traitements médicamenteux, mais aussi à des hospitalisations répétées suite à des épisodes de décompensation aiguë et à une mortalité élevée après la décharge hospitalière (un tiers des patient décès dans l'année suite à une décompensation cardiaque aigue). De fait, il apparait indispensable de développer de nouvelles pistes thérapeutiques dans la décompensation aiguë de l'ICC.

Il est bien décrit dans la littérature que l'ICC est associée à une dysfonction endothéliale qui se définit par une diminution du tonus vasodilatateur, principalement dû à une diminution de la production de monoxyde d'azote ou NO. De plus, différents traitements pharmacologiques associent une restauration progressive de la production de NO avec une amélioration de la fonction cardiaque. En revanche dans une situation d'urgence comme la décompensation aiguë de l'ICC de telles stratégies ne peuvent pas être employées, puisque la restauration de la production de NO est un phénomène lent.

L'amélioration de la fonction cardiaque et la survie à long-terme par un apport rapide de NO via l'administration des substances augmentant immédiatement la biodisponibilité de NO lors des phénomènes de décompensation cardiaque est donc une piste extrêmement prometteuse mais n'a jusqu'à aujourd'hui fait l'objet d'aucune étude. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer les effets cardiaques de deux substances augmentant la biodisponibilité de NO, suite à un épisode de décompensation aiguë. La décompensation sera induit 3 mois après induction de l'insuffisance cardiaque dû à l'infarctus de myocarde (due à une ligature coronaire chez le rat Wistar anesthésié) par gavage de NaCl. Le remodelage ventriculaire gauche et la perfusion myocardique seront déterminés sous l'anesthésie générale par échocardiographie et l'IRM avant et 1, 6 et 14 jours après l'administration de NaCl. De plus, l'hémodynamique ventriculaire (comme indicateur de la fonction cardiaque) sera déterminée sous l'anesthésie générale par cathéter intracardiaque 1 et 14 jours après l'administration de NaCl. Enfin, après l'évaluation hémodynamique, les cœurs seront prélevés après inhalation d'isoflurane à la dose de 5 % pour les études biochimiques tissulaires.

Pour répondre à cette question nous utiliserons en totalité 1098 rats (549 par source étudié) sur 5 ans.

Dans l'objectif de limiter les nombre d'animaux nécessaire dans ce programme de recherche nous œuvrons pour: 1. réduire les nombres d'animaux par l'utilisation des méthodes non invasives (IRM, échocardiographie) permettant de répéter les analyses sur le même animale au cours de la maladie ; 2. raffiner les modèles afin de limiter le nombre d'animaux par groupe (meilleur survie postopératoire permettant de limiter la mortalité dans le modèle d'infarctus du myocarde) et réutilisation de data obtenue dans des expériences antérieures, et des enrichissements des cages sont prévus conformément aux directives imposées par la législation et en accord avec les exigences du vétérinaire qui assure le suivi des animaux au sein de notre animalerie.

12030 La consommation d'alcool pendant la grossesse est reconnue comme responsable d'anomalies malformatives et neurologiques très graves chez les enfants. Les effets délétères de l'alcool au cours du développement ont été décrits pour la première fois en 1968 et les symptômes désignés sous le nom de « Syndrome d'Alcoolisation Fœtale ou SAF ».

La nocivité de l'éthanol pour le fœtus est maintenant bien établie et l'Académie de Médecine rappelle que le SAF est la première cause non génétique de déficience mentale et d'inadaptation sociale. Les symptômes du SAF sont irréversibles et peuvent conduire à l'âge adulte à des déficits intellectuels, des troubles cognitifs et une prédisposition de dépendance à l'alcool, à la nicotine et autres drogues. Le SAF constitue donc un réel problème de santé publique qui se traduit notamment par un retard de croissance, des malformations crânio-faciales et une atrophie du cerveau. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans ces effets de l'alcool restent mal connus.

Le Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) est un neuropeptide hautement conservé au cours de la phylogenèse qui a été isolé en 1989 à partir d'hypothalamus ovins pour sa

capacité à stimuler l'adénylcyclase. Des travaux réalisés par diverses équipes ont démontré que le PACAP exerce des activités neurotrophiques et neuroprotectrices en stimulant les processus de prolifération, différenciation ou encore de survie cellulaire dans des conditions physiopathologiques. En particulier, il a été établi que le PACAP protège les cellules neuronales de la mort apoptotique induite par l'éthanol et le stress oxydatif. L'implication du PACAP endogène a été évaluée face à la toxicité de l'éthanol dans le cerveau de l'adolescent et de l'adulte. Au cours du développement embryonnaire, le PACAP et ses récepteurs sont présents dans le cerveau de souris dès le 9^{ème} jour embryonnaire (E9), puis le niveau d'ARNm augmente pendant la période prénatale pour atteindre un maximum à la naissance, suggérant que le PACAP pourrait agir comme un puissant agent neuroprotecteur in vivo. Néanmoins, à ce jour aucune étude in vivo sur le potentiel effet trophique et protecteur du PACAP dans un modèle de SAF prénatal n'a été réalisée.

Cet aspect du projet, sera réalisé sur un modèle expérimental de syndrome d'alcoolisme fœtale (SAF) chez les souris SWISS gestantes qui recevront des injections journalières d'éthanol par voie intra-péritonéale à la dose de 1.5 g/kg à partir du 7^{ème} jour de gestation en absence ou en présence de PACAP. Le PACAP étant capable de traverser à l'aide d'un système de transport spécifique la paroi placentaire, il sera administré par voie intra-utérine qui permet une diffusion uniforme du PACAP à l'ensemble des embryons.

Afin de déterminer l'éventuelle corrélation entre l'évolution des lésions neuronales et le taux cérébral et plasmatique d'éthanol chez les mères gestantes et les progénitures (fœtaux E16 et post-natale d'âge jeune (P10) et adultes de 1 mois (P30), l'utilisation de l'animal est indispensable.

Afin d'étudier les effets du PACAP et de l'éthanol sur la différenciation des cellules nerveuses et leur proportion dans le cerveau de fœtus dont la mère est alcoolisée, nous avons choisi le modèle murin car il présente suffisamment de similitudes avec le cerveau humain pour extrapoler les résultats. Pour valider l'impact de l'alcool sur le développement embryonnaire in utero, nous utiliserons 4 groupes et chaque groupe comportera 15 femelles gestantes, soit un total de 60 souris femelles. Chaque portée est constituée généralement de 12 souriceaux ce qui devrait représenter 720 souriceaux. A cela il faut ajouter les 60 souris femelles et 10 souris mâles pour la reproduction, ce qui nous amène à 790 souris au total, minimum nécessaire pour l'étude.

Pour le Raffinement des expériences, les souris seront élevées conformément aux conditions recommandées dans des cages adéquates, avec un enrichissement du milieu et en présence d'un cycle jour / nuit de 12/12 h avec accès illimité à l'eau et à la nourriture. Par ailleurs, les animaux seront surveillés de façon quotidienne pendant toute la durée des cycles de reproduction. En cas de souffrance anormale, l'animal sera sédaté à l'isoflurane 5% avant d'être euthanasié. Egalement, tous les prélèvements se feront sous anesthésie. Afin de Réduire le nombre de femelles gestantes nécessaires à ce projet, dès que possible, les petits seront utilisés pour mesurer plusieurs paramètres (activité génique, mesure d'activité enzymatique, études histologiques...).

12031 La polyarthrite rhumatoïde (PR) et le psoriasis sont des maladies chroniques, inflammatoires. Ces pathologies entraînent douleurs et handicaps. Les causes sont inconnues ; certains facteurs génétiques, certains facteurs environnementaux (fumer augmente le risque de développer une PR) ou l'existence d'autres pathologies, sont autant de terrains favorables pour l'installation de ces maladies. Ainsi, le psoriasis est une pathologie au cours de laquelle les patients accumulent inflammation de la peau et des articulations ; on parle d'arthrite psoriasique. La PR est une maladie qui réduit non seulement la qualité de vie, mais également l'espérance de vie. Son coût est élevé pour la société.

Le développement de ces maladies peut se diviser en plusieurs phases : une phase d'initiation pendant laquelle les signes cliniques de la maladie sont invisibles, une phase chronique pendant laquelle le mécanisme inflammatoire chronique s'installe, et une phase aiguë ou de poussée sujette au mécanisme de destruction tissulaire.

Les traitements actuels peuvent permettre une rémission chez une minorité de patients, une amélioration du quotidien chez d'autres, cependant, nous ne mettons pas de côté les patients chez qui ces traitements sont transitoirement efficaces voir inefficaces. L'une des cibles thérapeutiques

est le TNF-alpha (« tumor necrosis factor-alpha ») dont les mécanismes d'action n'ont pas encore été totalement élucidés, ce qui pourrait expliquer certains échecs dans cette stratégie.

L'objectif de ce projet est de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques, directement ou indirectement liées à l'activité du TNF, placé au centre de ces maladies.

Nous devons pour cela mieux comprendre les mécanismes d'initiation et de maintien de la maladie tout au long de la vie d'un patient afin d'identifier les meilleures cibles. Les lymphocytes T jouent un rôle essentiel dans la PR. En effet, les données actuelles sur la différenciation lymphocytaire font apparaître que les lymphocytes T régulateurs qui expriment le facteur de transcription FoxP3, une sous-population de lymphocytes T, régulent négativement les réponses immunitaires et pourraient être des acteurs essentiels nécessaires au contrôle de la maladie.

Nous étudions ces cellules T régulatrices et leur rôle par rapport aux autres populations lymphocytaires chez l'homme et dans différents modèles expérimentaux comme l'arthrite expérimentale au collagène et l'arthrite chez la souris transgénique pour le TNFalpha humain qui récapitulent des aspects différents de la maladie humaine.

Nous étudions également les rapports entre ces cellules et les biothérapies de la polyarthrite rhumatoïde. Nous posons notamment la question de savoir si elles sont impliquées dans les résistances aux traitements ciblés comme les anti-TNF.

Les mécanismes que nous souhaitons étudier demandent d'avoir un système immunitaire complet et proche de celui de l'homme. L'utilisation de la souris est donc tout indiquée dans cette étude, mais se fera en accord avec la règle des 3R. Le nombre d'animaux utilisés dans les différentes procédures d'arthrite expérimentale et de psoriasis induit sera réduit au maximum afin de permettre des analyses statistiques solides. Des points limites destinés à limiter l'inconfort et la douleur des souris seront mis en place dans chaque expérience et tous les animaux seront pesés et leur comportement surveillé afin de veiller à leur bien-être. Ce projet de recherche nécessitera l'utilisation de 1320 souris sur 5 ans.

12032 Les lymphocytes CD8 sont des cellules du système immunitaire responsables de l'élimination des cellules infectées (par un virus ou une bactérie intracellulaire) ou tumorales. Lors d'une infection par un pathogène intracellulaire, les cellules CD8 naïves sont activées et se différencient d'une part en CD8 effectrices capables d'éradiquer les cellules infectées et d'autre part en CD8 mémoires. Les cellules mémoires se distinguent par une réactivité exacerbée au pathogène et permettent la protection à long terme de l'hôte. Cependant, certains contextes d'immunisation tels que les infections chroniques ou la mise en place d'un cancer, peuvent affecter cette capacité de protection des CD8 mémoires et induire des réponses de moins bonne qualité. D'autres facteurs, telle que la voie d'immunisation, peut également influencer sur la qualité de la réponse CD8 mémoire en modulant l'expression de molécules impliquées dans la migration. De plus, au cours d'une même réponse, plusieurs sous-types de CD8 mémoires de qualité différentes peuvent être générés.

Au cours des 20 dernières années, un grand nombre de molécules impliquées dans la génération et la survie des CD8 mémoires ont été identifiées, mais aucune ne permet, à l'heure actuelle, de prédire leur qualité de manière fiable. La mesure de la qualité des cellules mémoires générées nécessite donc des tests fonctionnels de survie, qui consistent à évaluer la capacité d'animaux auxquels on a injecté des cellules mémoires, à survivre à une infection virale. De plus, les mécanismes conduisant à la génération de différentes qualités de cellules mémoires sont encore partiellement incompris.

L'objectif de ce projet est de caractériser de façon fine, par des approches d'analyse sur cellule unique, les sous types de CD8 mémoires générés dans différents contextes d'immunisation et d'identifier les molécules associées à la protection. Pour cela, nous étudierons les cellules CD8 injectées chez des souris C57Bl/6J infectées par un virus (> génération de CD8 mémoires efficaces), ou ayant reçu une injection de cellules tumorales (> génération de CD8 mémoires à efficacité réduite).

Les différentes données obtenues, associées à l'évaluation de la capacité de protection de ces différents sous-types, seront utilisées pour générer et tester des modèles mathématiques visant à prédire la qualité de la réponse CD8 mémoire en fonction des molécules qu'elles expriment.

Le projet nécessitera l'utilisation de 2190 souris maximum. Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats.

Le choix du modèle souris est imposé par la nécessité de pouvoir utiliser des animaux génétiquement modifiés. De plus, la mise en place d'une mémoire immunitaire est un phénomène biologique complexe et dynamique, faisant intervenir de multiples types cellulaires et dont l'organisation spatiale rend impossible son étude dans des tests in vitro.

Les conditions d'élevage (hébergement, soins) ainsi que les procédures et points limites adaptés ont été définis afin de réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

12033 La Rétinopathie Pigmentaire (RP) est une maladie oculaire génétique grave qui touche environ une personne sur 3000 au niveau mondial. Cette maladie se caractérise par une perte progressive de la vision.

La rétinopathie pigmentaire se caractérise sur le plan clinique par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet suivie de la diminution de fonction des photorécepteurs à cône jusqu'à la cécité.

Les études menées antérieurement par l'équipe sur la RP ont mis en évidence que le gène *Nxn1* codait pour des protéines ayant une fonction protectrice sur les photorécepteurs à cônes, RdCVF « Rod-derived cone viability factor » et RdCVFL. RdCVF sécrété par les bâtonnets médie une activité protectrice sur les cônes en y activant l'entrée du glucose. RdCVFL (thiorédoxine), jouerait quant à lui un rôle protecteur des effets photo-oxydatifs de la lumière sur les bâtonnets et les cônes. Dans ce contexte, l'équipe a aussi démontré l'efficacité thérapeutique du RdCVF administré en sous rétinien à des modèles animaux mimant les RP par atteinte des bâtonnets (souris rd10, modèle récessif de la rétinopathie pigmentaire avec mutation spontanée du gène codant pour la sous-unité beta de la phosphodiesterase des bâtonnets (*Pde6b*)). Chez l'Homme, d'autres mutations sont à l'origine des RP dont une mutation liée à l'X du gène « retinitis pigmentosa GTPase regulator » (RPGR) exprimé à la fois dans les photorécepteurs à cône et à bâtonnet. Cette mutation qui est une des plus fréquemment retrouvée chez les patients, entraîne une rétinopathie pigmentaire liée à l'X et à évolution rapide.

Le but de la présente étude est d'évaluer l'efficacité du traitement par RdCVF chez les patients qui ont une RP par atteinte d'un gène exprimé à la fois dans les cônes et les bâtonnets. Dans cette étude, nous utiliserons un modèle murin qui présente une mutation spontanée dans le gène *Rpgr*, la souris Rd9. RdCVF sera administrée en sous rétinien à l'aide d'outils viraux.

Cet essai constitue la preuve de concept du traitement de la rétinopathie pigmentaire par injection de vecteurs codant pour RdCVF et RdCVFL pour les patients portant une mutation dans un gène exprimé par les bâtonnets et les cônes. Ce projet pourrait à terme être soutenu par la société Sparing Vision. De 120 animaux initialement prévu nous sommes aujourd'hui contraints de procéder avec un total de 720 animaux pour les mêmes procédures, incluant la standardisation du modèle et les contrôles. L'acuité visuelle des souris sera évaluée par des tests optocinétiques et la fonction des cônes par des électrorétinogrammes. La survie des photorécepteurs à cône sera évaluée en fin d'expérimentation par des études histologiques (e-conome) après euthanasie des animaux.

Si le traitement s'avère efficace sur les souris Rd9, cela nous permettrait d'élargir la thérapeutique par RdCVF aux patients dont la RP est due à un gène exprimé à la fois dans les cônes et les bâtonnets.

Les souris bénéficieront d'une anesthésie pour certaines procédures et seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries pour s'assurer de leur bien-être. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée.

Les conditions d'hébergements seront adaptées au modèle expérimental. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». Les animaux seront évalués à 1 mois d'âge, des résultats négatifs conduiraient à une interruption de l'expérimentation. L'objectif du projet implique l'utilisation d'animaux car la question des performances visuelles ne peut être étudiée in vitro.

12034 Avec le développement des biotechnologies et de la bio-ingénierie, de nouveaux biomatériaux / substituts / dispositifs médicaux sont en cours de validation. Nos laboratoires et leurs partenaires sont à la pointe de ce nouvel essor. Conformément à la réglementation régissant les dispositifs médicaux et plus particulièrement la norme ISO-10993 relative à l'évaluation biologique des dispositifs médicaux, nous sommes dans l'obligation de valider leur biocompatibilité in vitro (culture cellulaire 2D et 3D) puis sur animaux. L'objectif de ces procédures est donc de pouvoir tester après une solide validation in vitro les différents produits innovants de nos équipes et partenaires impliqués dans différentes thématiques (tissus de comblement, dermes équivalents, nouveaux biomatériaux, prothèses, implants).

L'ensemble de ces procédures se déroulera en accord avec les 3 Rs :

- Remplacement,

La première étape de validation sera effectuée in vitro afin de sélectionner les biomatériaux / substituts / dispositifs médicaux biocompatibles les plus performants. Cependant, cette première étape n'est pas suffisante d'un point de vue scientifique et réglementaire car elle ne permet pas de mesurer toutes les réactions de l'organisme (interactions multi organes impossible à recréer in vitro). C'est pourquoi les biomatériaux / substituts / dispositifs médicaux biocompatibles les plus performants seront testés in vivo. Le modèle animal choisi en accord avec la communauté scientifique (modèle utilisé dans des études scientifiques équivalentes) sera celui de l'implantation sous cutanée au sein de souris athymiques (nude).

La souris nude, en raison d'une mutation génétique naturelle, ne possède pas de thymus (ou un thymus rudimentaire). Elle est immunodéficiente, ce qui empêche le rejet de xénogreffes. Elle constitue donc un bon candidat pour l'implantation de nos dispositifs implantables. De plus, ces souris sont presque totalement dépourvues de poils, l'augmentation de tissu mou est donc facilement mesurable. La souris, malgré une différence de configuration anatomique, constitue un très bon modèle animal pour ce genre d'études.

- Réduction

Nos protocoles expérimentaux ont été rédigés dans le but de diminuer au minimum le nombre d'animaux impliqués tout en permettant de conserver des résultats fiables et statistiquement significatifs. La norme ISO-10993, partie 6, annexe B « Test methods for implantation in subcutaneous tissue » recommande de tester 10 échantillons tests et 10 échantillons contrôles par condition. Afin de suivre les recommandations de la norme tout en limitant le nombre d'animaux nécessaires, nous implanterons sur chaque animal 2 implants (1 de test et 1 de contrôle) réparti en miroir chacun sur une moitié de l'animal selon un axe médio-sagittal. Chaque animal sera son propre témoin. Nous aurons donc besoin de 10 animaux par conditions. Chaque groupe sera contrôlé selon 4 conditions de temps soit 2 semaines après implantations, puis au bout de 1 mois, 3 mois et 6 mois permettant de distinguer les réponses à court terme (2 semaines, 1 mois) et long terme (3 mois et 6 mois) sur 4 critères : 1) la réaction inflammatoire, 2) la néo-vascularisation, 3) la biodégradation des matrices, 4) la formation de nouveaux tissus.

- Raffinement

Nos protocoles expérimentaux prennent en compte la souffrance / angoisse / douleur afin de minimiser tout inconfort pour les animaux. Des mesures sont prises dès la stabulation avec un enrichissement du milieu. Des marqueurs précoces permettront de déterminer un score de douleur afin de mettre en place des procédures d'analgésie adaptées à l'intensité d'éventuelles douleurs. Si malgré ces mesures, l'état de l'animal ne s'améliore pas celui-ci sera exclu de l'étude et

euthanasié. Dans l'optique de minimisation de l'inconfort de l'animal, nous avons opté pour une anesthésie gazeuse (isoflurane) moins traumatique que par injection.

Nous prévoyons de tester 4 groupes par année soit pour les 5 ans un total de 800 animaux (4 groupes x 5 ans x 4 conditions x 10 animaux).

12035 Le syndrome métabolique, caractérisé par une obésité et un diabète de type 2, constitue un problème majeur de santé publique. Lié à la consommation d'aliments riches en graisses, ce syndrome se caractérise par la perte de sensibilité à l'hormone leptine, essentielle à la modulation de l'appétit. Il n'existe à ce jour aucun traitement pour contrer cette résistance à la leptine. Les endozépinines sont codées par le gène Diazepam Binding Inhibitor (DBI) et agissent sur trois récepteurs différents. Nos résultats antérieurs montrent que l'administration d'endozépinines diminue fortement la consommation alimentaire, selon un mécanisme de sensibilisation à la leptine, passant par la mobilisation de l'un des trois récepteurs des endozépinines. Notre projet vise à caractériser l'impact d'une suppression des endozépinines sur la régulation de la consommation alimentaire, de la glycémie et des dépenses énergétiques, ainsi que sur la susceptibilité de développer une résistance à la leptine sous régime alimentaire enrichi en graisses.

Les questions posées nécessitent deux lignées de souris génétiquement modifiées : 1) des souris chez qui le gène DBI, codant pour les endozépinines, a été invalidé ; 2) des souris chez qui une mutation a été introduite dans le gène DBI pour empêcher sélectivement l'action des endozépinines sur le récepteur responsable de leur modulation de l'appétit. Pour chacune de ces deux lignées, des souris contrôles non génétiquement modifiées issues des mêmes portées, seront incluses dans l'analyse. Ces souris seront réparties en deux groupes selon leur régime alimentaire (standard ou enrichi en graisses).

Dans le cadre des 3R, l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution in vitro n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'implication des endozépinines dans le contrôle de la consommation alimentaire et du poids corporel. Notre expertise nous permet de définir au plus juste le nombre d'animaux nécessaires aux mesures post-mortem terminales après 15 semaines de régime alimentaire. Pour la moitié de la cohorte, les animaux seront également utilisés pour des procédures peu invasives, dont une procédure raffinée d'analyse multiparamétrique de la consommation alimentaire et des dépenses énergétiques. Afin de minimiser la souffrance et l'angoisse liée au placement en cages individuelles de cette moitié de la cohorte sur les trois dernières semaines de régime alimentaire, les animaux seront placés en cages transparentes disposées côte à côte de sorte à permettre les contacts visuels et olfactifs entre congénères. Comme lors de l'hébergement en cages collectives, le milieu sera enrichi (Cocon, SERLAB). Par ailleurs, l'évaluation de la souffrance sera basée sur l'établissement d'un score de souffrance lors des mesures bihebdomadaires du poids corporel tout au long de l'étude et quotidiennement lors des procédures expérimentales, de sorte à administrer un traitement antalgique (Buprénorphine), ou sortir un animal de l'étude si nécessaire. Compte tenu du caractère non dommageable de l'inactivation totale du gène DBI, la mutation introduite pour invalider sélectivement l'action des endozépinines sur l'un de leurs 3 récepteurs devrait également s'avérer non dommageable. Notre suivi continu de l'ensemble des animaux nous permettra de nous assurer du caractère non dommageable des modifications génétiques employées et de limiter l'inconfort des procédures expérimentales.

Compte tenu du nombre de groupes expérimentaux et d'un effectif de 8 animaux par groupe, 256 souris mâles de génotypes appropriés seront nécessaires à cette étude. L'élevage des deux lignées nécessitera par ailleurs 204 animaux reproducteurs et aboutira à la production d'environ 788 souriceaux de sexe et/ou génotype non exploitables. Au total 1228 animaux seront donc utilisés.

12036 La connaissance globale des résistances génétiques aux pathogènes nécessite de déterminer les bases génétiques du contrôle de la réponse immunitaire dans le cadre de l'interaction entre les pathogènes et leurs hôtes domestiques afin de mieux comprendre les différents mécanismes sous-jacents.

Pour répondre à ce double objectif d'analyse du contrôle génétique de la réponse immunitaire et d'analyse du contrôle génétique de la résistance aux infections, des lignées ont été sélectionnées depuis 1994 en fonction des différents types de réponses immunitaires. Parmi celles-ci il y a la Lignée PHA (pour phytohématagglutinine), sélectionnée sur l'immunité à médiation cellulaire par réponse inflammatoire de sensibilité dermique retardée. Le processus de sélection des lignées « réponses immunitaires » implique un choix d'animaux futurs reproducteurs (dont l'effectif est nécessaire pour limiter une augmentation importante de la consanguinité) parmi la liste des candidats, sur la représentation des familles. Le nombre d'animaux jeunes mis en place est donc supérieur à celui des futurs reproducteurs. 200 animaux seront élevés et testés par an soit un total de 1000 animaux sur la durée du projet (5 ans). L'objectif du projet est la mise en œuvre de la procédure expérimentale « test PHA ou test phytohématagglutinine » de chaque génération pour la sélection de la lignée qui constitue un modèle animal unique pour étudier les incidences d'une sélection sur les réponses immunitaires chez la poule.

Réduction : le nombre d'animaux mis en élevage est nécessaire et suffisant pour assurer le renouvellement de la lignée.

Remplacement : compte tenu de l'objectif appliqué du projet en zootechnie, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico.

Raffinement : les poussins sont élevés en parquets collectifs, avec des enrichissements du type ficelles, balles en plastique, bloc à piquer. Les animaux sont visités 2 fois par jour et toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans le point limite engendrera l'euthanasie des animaux par le personnel qualifié.

12037 Grâce à ses nombreuses qualités organoleptiques, zootechniques et économiques, la perche Eurasiennne *Perca fluviatilis* est une espèce intéressante pour la diversification de l'aquaculture continentale européenne. Pour contrôler la reproduction de cette espèce, il existe des programmes photo-thermo-périodiques. En particulier, la hausse de la température avant la ponte est couramment utilisée par les pisciculteurs, qui travaillent en milieu contrôlé, pour induire l'émission du sperme chez les mâles. Ces habitudes reposent sur des connaissances empiriques basées sur les variations naturelles de la température mais sans validation scientifique et technique. En effet, contrairement aux femelles, il existe très peu d'information sur l'influence des conditions environnementales sur la qualité du sperme chez cette espèce.

L'objectif de ce projet est donc de déterminer les effets de la température, en phase pré-ovulatoire, sur la qualité du sperme de la perche (tâche 1) et sa capacité future de cryoconservation (tâche 2). À cette fin, des perches ont été soumises à des variations naturelles de température et de photopériode pendant 10 mois afin d'induire leur puberté, la spermatogénèse et enfin la production de sperme. Ce programme est caractérisé par le maintien d'une température de 6°C pendant 5 mois (période de vernalisation) puis par une remontée de la température sur un laps de temps de quelques semaines. Avant la remontée de la température, les mâles seront divisés en 2 groupes caractérisés par un niveau de température différente (procédure 1: température maintenue constante à 6°C après la période de vernalisation à 6°C ou remontée progressive de la température jusqu'à 12°C). Après 2 semaines d'acclimatation dans leur bassin à cette température constante (6°C ou 12°C), des injections d'hormones (GnRH, 100 mg/kg ; procédure 2) seront réalisées en vue d'induire la spermiation (production de sperme) et de récolter cette semence (procédure 3), quelques jours plus tard. Des poissons contrôles seront injectés avec une solution saline. Des poissons femelles seront utilisés pour l'évaluation des performances de reproduction pour chaque groupe (procédure 4: obtention d'œufs par massage de la cavité abdominale).

Afin de répondre aux objectifs, le projet mobilisera 35 poissons au total: 28 poissons mâles et 7 poissons femelles seront utilisés. Plus précisément, 14 mâles par conditions de température seront utilisés (7 poissons injectés avec de la GnRH ; 7 poissons contrôles). Le nombre de poissons par bassin a été choisi afin d'optimiser la densité des poissons, sachant qu'une densité beaucoup trop faible ou trop élevée est défavorable pour le comportement des espèces grégaires comme la perche.

Le nombre de poissons par température a été calculé afin d'obtenir une puissance statistique suffisante et nécessaire pour obtenir un résultat significatif tout en respectant la règle des 3R (Réduction). Le Remplacement par des méthodes cellulaires ou moléculaires est impossible à ce stade vu la complexité des interactions que nous visons d'étudier ici. En vue de limiter l'impact de cette expérience sur les organismes, les prélèvements de sperme se feront après anesthésie. Et, tout au long de l'expérience, l'apparition des points limites (changement de l'activité de nage, du comportement alimentaire, apparition de nécroses ou de champignons) sera surveillée et toute souffrance de l'animal déclenchera sa sortie de l'expérience (Raffinement), il sera placé sous contrôle pour être soigné en quarantaine ou mis à mort selon les recommandations du responsable bien-être.

12038 La peau est le plus étendu des organes du corps humain qui assure plusieurs fonctions vitales pour l'organisme. Cet organe est soumis tout au long de la vie à de nombreux dommages, provoqués par des facteurs extérieurs d'origine physique (coupures), mécanique (ulcères), thermique (brûlures) et/ou chimique (radiations). La sévérité des dommages couplés à d'autres facteurs, tels que l'âge, le diabète et la nutrition, peuvent conduire à une mauvaise voire non-cicatrisation des plaies, appelées les plaies chroniques. Elles impactent fortement la qualité de vie des patients, jusqu'à engager leur pronostic vital. Ce problème de santé publique est amené à s'accroître avec le vieillissement de la population et l'augmentation de la prévalence du diabète et de l'obésité.

Les avancées dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la réparation des plaies, ont conduit au développement de biomatériaux implantables basé sur la mise au point de supports tridimensionnels qui représente une des thématiques de notre équipe.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de biomatériaux actifs et d'origine naturelle développés au laboratoire. Ces biomatériaux se présentent sous forme de patch, destinés à délivrer des molécules bioactives qui améliorent le processus de cicatrisation cutanée. Nous souhaitons déterminer le devenir de ces biomolécules dans les couches de la peau après lésion cutanée. Les dispositifs bioactifs seront appliqués directement sur la plaie induite chez le rat.

Parmi les modèles de plaie cutanée qu'on retrouve dans la littérature, nous avons retenu celui faisant appel à une biopsie totale de peau pour étudier la libération des molécules bioactives au sein de la plaie par imagerie nucléaire. La procédure est de courte durée et l'animal sera anesthésié tout au long : après biopsie cutanée, les biomatériaux seront apposés au sein de la plaie et l'imagerie sera effectuée 2h après pour finir par l'euthanasie de l'animal.

Les mesures nécessaires seront prises pour limiter la douleur et le stress des animaux par l'utilisation d'anesthésiants et d'analgésiques au cours de l'induction du modèle de biopsie cutanée et de l'imagerie.

La cicatrisation est un processus complexe et les méthodes d'analyse in vitro ne prennent pas en considération l'environnement local et systémique des plaies. De plus, à ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives pour modéliser la cicatrisation cutanée, donc l'utilisation de modèles animaux est nécessaire pour évaluer l'efficacité de notre dispositif. Pour réaliser cette étude nous avons tenu compte du nombre d'animaux à évaluer de façon à obtenir les informations scientifiques recherchées en fonction des risques statistiques d'erreur (5%) et de la puissance des tests (80%). Le nombre d'animaux utilisés pour la période du projet a été évalué à 60 rats sur 2 ans. L'ensemble des animaux sera euthanasié à la fin de l'expérience.

12039 L'antibiorésistance constitue une menace planétaire pour la santé humaine et animale, la médecine se trouvant progressivement désarmée dans la lutte contre les infections à bactéries multirésistantes. Un usage prudent et responsable des antibiotiques chez les animaux passe par une optimisation de l'efficacité des traitements pour lutter efficacement contre les bactéries responsables d'infection tout en limitant l'apparition de résistances bactériennes aux antibiotiques pour les bactéries pathogènes comme pour les bactéries de l'hôte, notamment celles contenues dans le système digestif.

Dans un contexte national et européen de limitation et d'optimisation des antibiotiques en santé animale en corrélation avec le plan Ecoantibio 2, il nous apparaît primordial d'optimiser les traitements antibiotiques recommandés en première intention chez le cheval, afin de limiter l'apparition de résistance bactérienne contre ces antibiotiques.

Chez les équidés, la pénicilline est recommandée en première intention dans le traitement contre un certain nombre de bactéries dont *Staphylococcus aureus* et les streptocoques, pathogènes majeurs chez le cheval. Cependant, il n'existe quasiment aucune donnée (pharmacocinétique, cliniques) sur les esters utilisés en France, il n'est donc pas garanti que les doses préconisées par les fabricants soient les plus adaptées.

Les objectifs scientifiques de cette étude sont donc :

- d'étudier précisément le devenir de 3 médicaments contenant de la pénicilline autorisée chez le cheval en France dans les conditions préconisées par leur notice : la Dépocilline NDV, la Duplocilline NDV, et le Pénétavet NDV ;

- de calculer des indices permettant de prédire l'efficacité ou non des traitements antibiotiques contre des bactéries rencontrées fréquemment chez les chevaux ;

- dans l'éventualité d'une inadéquation des protocoles de traitement proposés dans les notices, proposer des doses et intervalles permettant une lutte efficace contre les pathogènes les plus fréquemment rencontrés.

Les applications attendues sont :

- l'utilisation facilitée et donc plus fréquente de la pénicilline, antibiotique de première intention, par rapport aux antibiotiques de seconde et troisième génération ; afin de préserver leur efficacité plus longtemps, pour l'animal comme pour l'Homme ;

- l'amélioration de l'efficacité des traitements antibiotiques afin de diminuer le risque d'apparition d'antibiorésistance.

Six chevaux seront utilisés pour cette étude et ils recevront une injection intramusculaire quotidiennement pendant 3 jours à chacune des 3 phases. Des prélèvements sanguins et un prélèvement d'urines seront également réalisés.

Ces médicaments seront utilisés sur l'espèce cible en utilisant le nombre minimal de chevaux permettant d'avoir une puissance statistique suffisante pour étudier les résultats obtenus. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, chaque cheval recevra successivement un traitement sur une période de 3 jours avec chacun des trois médicaments, chaque période étant séparée de 3 mois.

Cet essai se déroulera sur 6 chevaux régulièrement utilisés dans un centre équestre pour éventuellement identifier une gêne résultant des injections intramusculaires, un suivi de tolérance locale sera également effectué. De plus, afin de s'assurer du bon état de santé des chevaux, ils seront tous observés matins et soir afin de déceler un éventuel trouble, même les jours où ils n'auront pas eu d'administration et seront pesés régulièrement. Si le suivi clinique d'un animal révèle une intolérance ou un effet secondaire majeur, l'expérimentation sera arrêtée sur l'animal en question et des soins appropriés seront effectués par le vétérinaire référent. Cet essai se fera en conformité avec les lignes directrices européennes sur l'espèce cible. Compte tenu de la nature de l'essai, les chevaux continueront leurs activités sportives après l'essai. De plus, les chevaux ne seront confinés au box que pendant la première journée d'administration et pendant deux heures et demie les 2 jours suivants.

12040 La pollution environnementale liée aux polluants organiques persistants (POP) et ses conséquences en termes de transfert dans la chaîne alimentaire est une problématique d'ampleur dans nos sociétés. Les POP sont des composés chimiques, à l'origine de nuisances avérées sur les écosystèmes et la santé humaine (perturbateurs endocriniens, neurotoxicité...). Des polluants organiques tels que la Chlordécone (CLD) impactent les sols agricoles dans les régions contaminées (Près de 25% de la surface agricole utile impactée). Bien que cette molécule soit interdite d'utilisation en France depuis des décennies, elle perdurera dans les sols pendant plusieurs dizaines voire centaines d'années, posant la problématique du maintien de pratiques. Les animaux

ingèrent involontairement des quantités non négligeables de sol, et par ce biais les contaminants peuvent s'accumuler dans les denrées d'origine animale. Afin de préserver la santé des consommateurs et de sécuriser les denrées alimentaires, l'Union Européenne a fixé des valeurs limites de résidus dans les aliments (Règlements CE N° 839/2008, Règlement UE N°1259/2011), modifiées fin 2018 dans un arrêté (pour la viande bovine). Les plans de surveillance mis en place ont permis d'identifier un nombre problématique de carcasses non conformes (contamination Chlordécone aux Antilles, plusieurs dizaines de carcasses et une centaine de foies détruits entre 2011 et 2015).

Les potentialités de séquestration des POP par les matrices hautement carbonées apparaissent comme des voies prometteuses de gestion de ce risque. Demeure la problématique de l'efficacité de ce piégeage alors même que le polluant est déjà retenu par les constituants de ce sol, notamment la matière organique. Cette efficacité dépendrait des caractéristiques de la matière hautement carbonée, caractéristiques liées au matériau originel ainsi qu'au traitement de pyrolyse.

Plusieurs travaux ayant trait à la problématique de la séquestration de polluants organiques (PCB) ont déjà été valorisés au sein de notre laboratoire. Cependant une telle approche centrée sur des matrices séquestrantes produites directement aux Antilles en utilisant des matériaux locaux, des déchets verts abondants, n'a pour le moment pas été abordée. Cette étape est nécessaire avant d'envisager de possibles applications de remédiations sur des terrains contaminés.

Le projet consiste à caractériser, d'une part, l'impact de la séquestration de la CLD par du biochar et charbon actifs ajouté en tant qu'amendement à deux sols antillais. Les résultats obtenus seront consignés d'autre part dans une base de données en vue d'alimenter un modèle générique permettant de simuler la contamination d'un animal élevé en plein air suivant les méthodes d'élevage utilisées.

Pour ce faire 48 porcelets mâles castrés et sevrés (40 jours) seront mobilisés pour cette expérimentation. Le recul que nous avons pu obtenir sur ce modèle et ce type de séquestration des contaminants, nous permet de fixer un nombre raisonné de répétitions (n=4) pour obtenir une puissance statistique satisfaisante au regard de nos hypothèses. Il ne peut être envisagé de remplacement sur cette thématique et les animaux seront mis à mort après l'expérimentation. Des étapes de sélection de matrice hautement carbonées d'intérêt ont été réalisées en amont afin de limiter le nombre d'animaux impliqués. Ces sélections se sont basées sur les caractéristiques de ces matrices et deux tests in vitro.

Même si les porcelets sont exposés à des polluants (la chlordécone) la dose mimera une exposition environnementale. En se reportant aux seuils toxicologiques, il apparaît que les doses employées ne devraient pas engendrer de troubles ou de souffrance pour les animaux. Un maintien temporaire (3h) en compartiment individuel apparaît cependant nécessaire afin de maîtriser l'ingestion. Ce contrôle est un point très sensible de l'expérimentation. Les conditions de l'animalerie ont été optimisées pour réduire au mieux l'impact de ce maintien : le contact visuel et olfactif sera préservé pendant cette période quotidienne mais courte. Des éléments assurant la distraction des porcelets seront, de plus, ajoutés dans les cages. Bien qu'aucune souffrance n'ait pu être observée lors des expérimentations similaires précédentes, une évaluation quotidienne de comportements annonciateurs de cette souffrance sera réalisée. Un suivi du poids tous les trois jours sera de même réalisé pour identifier toute perte excessive de poids. Ces éléments permettront d'assurer le caractère éthique de cette expérimentation. Une mise à mort des porcelets sera réalisée à la fin de l'expérimentation.

12041 La maladie d'Huntington, associée à la dégénérescence des neurones de certaines régions du cerveau, présente un ensemble de symptômes moteurs, cognitifs et comportementaux. Le décès des patients survient en moyenne vingt ans après l'apparition de ces symptômes. Les modèles murins précédemment utilisés montraient des symptômes différents de ceux de l'Homme. Une lignée de souris génétiquement modifiées récemment produite, la lignée zQ115ND, présente des symptômes et une évolution phénotypique de ces derniers plus proche de ce qui est observé chez l'Homme.

Ce projet vise à étudier dans cette nouvelle lignée de souris les modifications génétiques, moléculaires, cellulaires et comportementales liées à la maladie et à son évolution au court du temps.

Le nombre total de souris utilisées dans ce projet sera de 756.

La règle des 3R a été considérée tout au long de l'élaboration de ce projet et sera appliquée au quotidien. Pour la réduction, des expériences précédentes nous ont permis de définir le nombre minimal d'animaux permettant de générer des données statistiquement solides. Concernant le raffinement, pour toute cette étude, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Ils feront l'objet d'un contrôle quotidien par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées. Ces contrôles seront enregistrés. Des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux (injection d'antalgiques ou bien mise à mort par injection d'une surdose d'anesthésique). Concernant le raffinement, les animaux seront hébergés en groupe d'au moins 2, dans un environnement à température contrôlée, sur portoir ventilé, avec cycle diurne-nocturne de 12h. L'eau, la nourriture sont fournies ad libitum (sauf pour un temps limité dans la procédure 3) et un nid végétal est placé dans les cages de manière à offrir aux animaux un minimum d'enrichissement. Les animaux sont visités chaque jour. Concernant le remplacement, des études in vitro sur cellules sont utilisées dès que possible, toutefois les expériences de comportement comme l'évaluation des capacités motrices ne peuvent se faire dans des expériences in vitro.

12042 Dans le cadre d'une formation de haut niveau (pour thésards et chercheurs), l'objectif de ce projet est l'organisation de travaux pratiques sur l'enregistrement extracellulaire de l'activité neuronale in vivo chez la souris employant des multi-électrodes à très haute densité, une technologie en plein essor. Les étudiants auront préalablement reçu des informations théoriques en présentiel et des démonstrations sur les expériences.

L'insertion des électrodes dans le cerveau de souris nécessite une procédure chirurgicale de craniotomie, une ouverture du scalp et du crâne, réalisée sous anesthésie générale après préparation du champ opératoire, contrôle de la profondeur de l'anesthésie. Les animaux seront maintenus dans une anesthésie profonde tout au long de la procédure avec en complément l'injection d'un antidouleur et seront mis à mort sans s'être réveillés.

Avantages : les étudiants pourront mettre en pratique l'enregistrement avec les multi-électrodes.

Domages escomptés. Les animaux subiront la procédure de l'anesthésie et l'anesthésie nécessaire à la procédure sera maintenue jusqu'à la mise à mort des animaux par dislocation cervicale sous l'effet de l'anesthésique. Des points limites seront utilisés à l'aide de grilles de score pour déterminer l'ajustement du dosage d'anesthésique ou la sortie de procédure.

L'ensemble des procédures seront réalisées sous le contrôle d'enseignants possédant une formation concepteur et/ou applicateur et ayant validé une formation réglementaire à la chirurgie et sous contrôle vétérinaire.

Le projet impliquera au maximum 50 souris sur 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé par l'organisation de groupes de participants qui auront reçu au préalable une formation théorique.

12043 L'hibernation est une stratégie des animaux endothermes qui leur permet de faire face aux baisses saisonnières des ressources alimentaires. Cependant, plusieurs études évoquent les limites de cette stratégie dans des milieux à fort impact humain chez différentes espèces : ours brun, marmotte, chauve-souris, hamster d'Europe. Des modifications anthropiques des conditions environnementales perturberaient le cycle annuel des hibernants avec des conséquences désastreuses pour leur survie. Pour le hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*) en particulier, un déclin des populations est observé depuis les années 1970 en Europe de l'Ouest et s'étend aujourd'hui à toute son aire de répartition jusqu'en Ukraine. Des mesures de protection en Europe de l'Ouest n'ont pas suffi à enrayer ce déclin.

Parmi les causes évoquées du déclin, les ressources alimentaires du hamster d'Europe seraient inadéquates en termes de quantité, qualité ou même de temporalité en raison des pratiques agricoles actuelles qui modifient l'habitat de l'espèce. Or, la prise alimentaire, l'état des réserves corporelles et la dépense énergétique jouent un rôle crucial dans la survie et la reproduction des hibernants. Dans ce projet, nous allons mesurer l'effet de différents régimes alimentaires similaires à ceux trouvés dans le milieu naturel du hamster d'Europe (céréales ou luzerne) sur la qualité de l'hibernation et le succès reproducteur de cette espèce.

100 hamsters par an seront utilisés dans le cadre de ce projet (500 au total sur la durée du projet). Ils seront lâchés en milieu naturel à l'issue des expériences ou conservés jusqu'à leur mort naturelle.

Dans nos protocoles expérimentaux nous mettons en œuvre la règle des 4R en réduisant le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour qu'une différence éventuelle entre les différents groupes puisse être statistiquement décelée. En termes de raffinement, nous nous adaptons au cycle saisonnier de l'espèce en limitant les manipulations pendant les torpeurs. Nous enrichissons l'environnement des animaux (tubes en PVC qui leur servent de refuge, papier pour se constituer un nid, bouts de bois à ronger). Enfin, les manipulations sont faites sous sédation afin de limiter le stress des animaux et un analgésique est utilisé pour réduire la douleur liée à la chirurgie. Cette étude ayant pour objectif ultime de trouver des cultures favorables au hamster d'Europe afin d'améliorer l'état de conservation des populations naturelles, nous ne pouvons pas remplacer cette espèce par un autre modèle d'étude. Enfin, les animaux seront réhabilités après la reproduction puisqu'ils seront relâchés dans le cadre des mesures de renforcement des populations sauvages.

12044 Contexte et objectifs

La pollution de l'air représente un risque environnemental majeur pour la santé et parmi les effets sanitaires, les maladies cardiovasculaires sont au premier plan. L'organisation mondiale de la santé a estimé à près de 3.7 millions de décès prématurés imputables à la pollution de l'air extérieur dans le monde en 2012 et plus de 80% de ces décès sont principalement dus à des cardiopathies ischémiques ou des accidents vasculaires cérébraux. Par ailleurs, des études épidémiologiques récentes suggèrent que des expositions à des pics de pollution ou des expositions chroniques à certains polluants peuvent augmenter le risque d'hypertension artérielle (HTA), principal facteur de risque de morbidité et de mortalité dans le monde. La pollution de l'air est un mélange complexe de différents polluants dont le dioxyde d'azote (NO₂) qui représente un polluant d'intérêt compte tenu de son pouvoir oxydatif et dont les valeurs limites peuvent être fréquemment dépassées, en particulier en proximité du trafic routier. Cependant, il existe encore peu d'études permettant de mettre en évidence le lien qui pourrait exister entre l'inhalation au NO₂ et l'HTA. Parmi les mécanismes potentiellement impliqués, le stress oxydatif est un élément essentiel de la dysfonction vasculaire induite par la pollution de l'air et l'augmentation de marqueurs de stress oxydatif et d'inflammation a été mise en évidence lors d'exposition à des émissions de moteur diesel ou à des particules fines. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est d'établir le lien éventuel qui peut exister entre l'exposition au NO₂ et l'HTA en ciblant des marqueurs de la dysfonction endothéliale, du stress oxydant et de l'inflammation.

Méthodologie

Pour réaliser cet objectif, des rats hypertendus (modèle de rat « Spontaneously Hypertensive Rat », SHR) seront exposés ou non à du NO₂. Des rats Wistar-Kyoto, (WKY) seront également inclus au protocole et serviront de contrôles normotendus.

Les animaux utilisés au moment du protocole d'exposition seront des rats mâles âgés de 22 à 24 semaines acclimatés aux conditions de l'animalerie. Seuls des rats mâles seront utilisés car il est plus difficile d'interpréter les résultats de rats femelles compte tenu de la variabilité des réponses liées au cycle hormonal, ce qui nécessiterait une augmentation de l'effectif étudié. Les manipulations seront réalisées dans le respect de la réglementation en vigueur (directive 2010/63/UE). Les mesures de pression artérielle seront réalisées avant le début des expositions et à la fin du protocole d'exposition, par plethysmographie (mesures non invasives). Les rats seront exposés, en aigu et en subchronique, à du NO₂ à une concentration proche de celle trouvée à

proximité d'axes routiers. Les animaux témoins seront exposés à de l'air pur filtré. Aucune mesure invasive chez l'animal ne sera entreprise. Un groupe de rats SHR sera exposé pendant 3 heures consécutives par jour, cinq jours par semaine, pendant trois semaines, au NO₂. Un groupe d'animaux SHR sera également nécessaire pour évaluer l'effet d'une seule exposition aux NO₂ dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour les expositions répétées. Après anesthésie et euthanasie des animaux, les tissus sanguins, pulmonaires, cardiaques et vasculaires seront prélevés. Cette phase nécessitera 48 animaux. Après cette première phase, et en fonction des résultats obtenus, le protocole sera répété afin de tester l'efficacité d'un système de dépollution, ou le cas échéant, la concentration obtenue après ce système de dépollution. Cette deuxième phase nécessitera l'utilisation de 48 animaux, soit un total de 112 rats.

Dans l'objectif de limiter le nombre d'animaux nécessaire dans ce programme de recherche nous appliquerons la règle de 3 R. Pour réduire les nombres d'animaux nous utilisons des méthodes non invasives (échocardiographie et pléthysmographie) permettant de répéter les analyses sur le même animal au cours de la maladie et nous réutilisons des données obtenues dans des expériences antérieures, et nous pratiquons des enrichissements des cages sont prévus conformément aux directives imposées par la législation et en accord avec les exigences du vétérinaire qui assure le suivi des animaux au sein de notre animalerie.

Apports attendus

Ce travail expérimental permettra de recueillir de nouvelles connaissances sur les impacts sanitaires de la pollution de l'air et de contribuer à l'évolution des normes dans le domaine de la qualité.

12045 Certaines pathologies s'accompagnent du développement de douleurs chroniques, persistant en l'absence d'atteinte tissulaire. De façon surprenante, le développement de ces douleurs chroniques est sujet à une large variabilité au sein d'une population donnée, et les mécanismes qui favorisent le développement de ces douleurs restent très peu connus. Ce projet vise à identifier les mécanismes moléculaires par lesquels une protéine particulière (la myosine IA), exprimée par certains neurones sensoriels, influe sur la mise en place de ces douleurs.

La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation d'animaux déficients pour la Myosine 1A et de souris sauvages. 6 groupes (3 groupes sauvages et 3 groupes mutants) de 30 animaux chacun seront réalisés qui subiront une injection de zymosan dans la patte arrière droite. Les animaux seront sacrifiés avant, 2 Jours et 10 jours après induction de l'inflammation et la moelle épinière prélevée pour une caractérisation des propriétés électrophysiologiques des neurones dans chacun des groupes expérimentaux.

Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes qui président à la transformation des douleurs aiguës en douleurs chroniques.

Dans cette étude, la réduction du nombre d'animaux est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique (hétérogénéité inter-individuelle et diversité neuronale dans la moelle épinière). Le nombre de souris utilisées dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas ainsi 30 animaux par groupe. La réalisation de ce projet dans son ensemble nécessite l'utilisation de 180 souris (Myo1A et C57Bl6) sur une durée de 3 ans. Le recours au modèle animal est indispensable car aucun modèle *in vitro* (cellules ou tissus) ne peut reproduire l'organisation des réseaux spinaux dans les conditions naïves et/ou pathologiques. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne renforcée, et les points limites définis permettront de maîtriser la douleur induite.

12046 Le caractère plaisant ou déplaisant d'un événement peut être influencé par notre état émotionnel. Cette action de l'humeur sur la perception des événements de la vie pose la question de ses bases biologiques. Les neurones dopaminergiques (DA) de l'aire tegmentale ventrale (VTA) sont un élément clé dans l'évaluation de la valeur émotionnelle et motivationnelle d'un événement. Ils sont ainsi impliqués dans des pathologies telles que la dépression. Des progrès récents ont montré le rôle majeur de l'équilibre entre entrées anatomiques inhibitrices et excitatrices sur ces neurones

DA, ce qui est important dans leur capacité à intégrer les informations. Le but général de notre recherche est de comprendre les altérations de cette balance excitation/inhibition régulant l'activité des neurones DA de la VTA dans la dépression.

Les entrées inhibitrices contrôlant les neurones DA de la VTA sont notamment issues d'une structure appelée la queue de l'aire tegmentale ventrale (tVTA). Des travaux antérieurs ont permis de donner une définition anatomique claire de la tVTA chez le rat, mais les récentes avancées scientifiques ont pour conséquences que les recherches se font de plus en plus chez la souris. Cependant rat et souris sont deux espèces de rongeurs différentes et pour nos futurs travaux il est important de définir clairement l'anatomie de la tVTA chez la souris.

Nous réaliserons également une caractérisation anatomique de la tVTA chez deux autres espèces de rongeurs : un rongeur diurne (actif durant la journée contrairement à la souris et le rat), l'arvicanthis et un rongeur à reproduction saisonnière, le hamster doré. Cela nous permettra d'identifier des voies anatomiques impliquées dans les états dépressifs saisonniers, et de mettre en évidence des différences entre espèces de rongeur. Enfin, afin de mieux localiser la tVTA, une étude pharmacologique consistant en l'injection de drogues pouvant induire des marqueurs dans la tVTA sera réalisée chez ces rongeurs.

L'objectif général de ce projet est ainsi de comparer (et de compléter) les connaissances anatomiques de la tVTA obtenue chez le rat avec celles obtenues dans trois autres espèces de rongeurs : la souris, l'arvicanthis et le hamster doré. Des cartographies anatomiques seront réalisées grâce à des études de traçage (injections cérébrales de traceurs conventionnels et viraux) et les études pharmacologiques par des injections de drogues.

Le projet nécessitera au maximum 2100 animaux comprenant souris (C57BL6J, DAT-cre, GAD-cre), rats (Sprague Dawley), arvicanthis et hamster doré. Il sera conduit en respectant la règle des 3R. L'étude de voies anatomiques nécessite l'utilisation d'animaux et ne nous permet pas de remplacement. Des études préliminaires nous permettront de réduire les effectifs des expériences de cartographies. En ce concerne le raffinement, le bien-être animal sera amélioré grâce l'hébergement des animaux en groupe dans des cages enrichies. Les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie pré, per et post-opératoire permettant de limiter ainsi la souffrance et le stress imposés aux animaux. Les animaux seront observés tous les jours afin de déceler tout signe d'inconfort ou de stress et des fiches d'évaluations individuelles nous permettront de suivre la bonne récupération des animaux après les chirurgies.

Les études neuroanatomiques sont principalement qualitatives et ne nécessitent pas d'études statistiques. Pour l'étude pharmacologique, des tests statistiques non paramétriques seront utilisés (Wilcoxon, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis). Ce projet comporte 5 procédures expérimentales. Pour toutes les espèces, les animaux mâles et femelles seront utilisés.

12047 La surdité touche plus de 5% de la population mondiale. Les résultats de la réhabilitation de l'audition ont des résultats variables sur les performances auditives et langagières. Les facteurs influençant les performances sont la durée de la surdité et le site lésionnel au sein de la cochlée (organe qui permet d'entendre). Ces deux paramètres sont difficiles à préciser et quantifier. L'étude des liquides contenus dans la cochlée pourrait permettre de mieux préciser ces facteurs et de mieux connaître les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les surdités.

L'objectif de cette étude est de réaliser un modèle ovin de surdité (N=12) puis de comparer la composition des liquides de la cochlée en fonction du statut normo-entendant versus surdité. Ce modèle animal a l'avantage d'avoir une anatomie de l'oreille et un spectre auditif comparable à l'homme. Nous réaliserons une imagerie IRM/TDM de l'oreille des animaux afin de s'assurer de l'absence de malformation. Sous anesthésie générale, l'audition des animaux sera contrôlée par l'étude électrophysiologique des réponses auditives et les prélèvements des liquides de la cochlée et du sang seront effectués sur l'oreille normo-entendante. Une partie des brebis sera exposée à une substance ototoxique ou l'exposition à un bruit pour induire une surdité. Un mois plus tard, après vérification de la surdité, un prélèvement des liquides de la cochlée et de sang seront effectués. Une comparaison de la composition des liquides de la cochlée en fonction du statut

normo-entendant versus surdité sera alors effectu e. Le choix du modèle animal s'est porté sur les brebis devant la similarité anatomique et physiologique de leur oreille interne avec l'homme.

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

Remplacement : Une étude pré-clinique chez l'animal est nécessaire afin de comparer le liquide de la cochlée chez des animaux normo-entendants avec celui d'animaux sourds, ce qui n'est pas possible chez l'homme car cela entraînerait une surdité irréversible et non appareillable. De plus, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle in-vitro ou in-silico.

Réduction : Sur la base d'une analyse statistique et bibliographique, notre étude nécessite douze animaux. Afin de réduire le nombre d'animaux, chaque brebis sera son propre témoin sur le statut normo-entendant/surdité.

Raffinement : Les brebis normo-entendantes seront h berg es ensemble. Les animaux atteints de surdité seront gardés dans un enclos comportant au minimum 2 animaux pendant 1 mois avant que le second prélèvement des liquides de l'oreille interne soit effectué. Les animaux seront observés une fois par jour afin d'évaluer leur stress/leur douleur après les différentes procédures r alis es sous anesthésie générale. La douleur sera prise en charge par une analgésie adapt e. Le second prélèvement des liquides de l'oreille interne entraînera une surdité définitive imposant la mise à mort de l'animal.

12048 Le bien-être du cheval est devenu un véritable enjeu pour la filière équine mais son évaluation reste complexe et nécessite de prendre en compte un ensemble d'indicateurs à la fois comportementaux et physiologiques. Récemment, des liens entre stress psychologiques, altération du comportement, modification du microbiote intestinal et du profil d'expression de certains gènes (transcriptome) ont été mis en évidence. Ainsi, nous proposons une évaluation globale du bien-être alliant des études du comportement, du microbiote intestinal, du transcriptome et de la santé de 218 chevaux de sport, afin d'identifier un faisceau d'indicateurs qui alerteraient efficacement sur l'état de mal-être des animaux, et comprendre comment le stress psychologique peut avoir des effets délétères sur la santé physique. Les chevaux seront étudiés lors d'une période en box individuel d'au minimum 9 mois et lors d'une période en pâture en groupe pendant 1 mois. Nous n'étudierons qu'une seule alternance box / pré. La durée d'un mois en pâture est fix e par la structure. Il est possible que pour des animaux en mal-être, une telle durée ne soit pas suffisante pour permettre une amélioration effective du niveau de bien-être. Cependant, il s'agit d'une pratique standard dans de nombreux centres équestres, qui mettent très souvent leur cavalerie en pâture en groupe pendant la période estivale, lors des vacances scolaires. Les résultats de cette partie de l'étude pourront apporter des éléments pertinents applicables aux nombreux chevaux vivants ce type de situation. Sur le site de Saumur, les chevaux sont tous hébergés en box individuel d'environ 9m², nettoyés 6 jours sur 7. La grande majorité des individus sont hébergés sur paille, mais quelques-uns vivent sur copeaux ou pellets pour des soucis sanitaires. Les boxes présentent une fenêtre sur l'extérieur, une ouverture sur le couloir de l'écurie, ou les deux. Pour la majorité des chevaux, une grille est présente dans le box et permet des contacts visuels et tactiles limités avec un congénère voisin. Les chevaux reçoivent environ 10 kg de foin par jour et 3 repas d'aliments concentrés. Il s'agit de conditions standards aux conditions d'élevage et de détention des  quid s. Les observations comportementales consisteront en des relevés comportementaux à distance, des tests de relation à l'humain et des enregistrements vidéo tout au long du projet. L'analyse du microbiote sera r alis e à partir de prélèvements de fèces dans le rectum des animaux, afin d'éviter une contamination des échantillons par le milieu externe. Il s'agit d'une pratique d'élevage courante utilis e notamment pour évaluer les désordres digestifs. L'analyse du transcriptome sera effectu e à partir de prises de sang. Ces deux prélèvements se feront au début et   la fin de la période pass e au box et au début et   la fin de la période pass e au pâturage. Ceci nous permettra d'évaluer le bien-être des animaux dans un milieu de vie classique pour des chevaux de sport (box individuel) et d'étudier la résilience des  tats de mal-être après le retour à des conditions de vie plus naturelles (pâturage). L'étude de la santé consistera à relever toutes les pathologies survenues pendant le projet dans un carnet de santé individuel.

Prise en compte de la règle des 3R : Remplacement : Compte tenu de l'objectif du projet qui est d'évaluer le bien-être des chevaux sur le terrain, le modèle animal ne peut être substitué par un autre type de modèle in vitro ou in silico. Réduction : Nous nous attendons à observer une très forte variabilité dans les réponses comportementales et physiologiques d'animaux vivants au sein d'un même environnement. Ainsi, un nombre élevé d'animaux permettra de dégager des résultats significatifs et généralisables à l'ensemble des chevaux vivants dans les mêmes conditions de vie, ainsi que d'envisager des éventuels retraits. Aucun dommage ne sera induit sur les animaux car nous n'impacterons pas leur mode de vie habituel. Raffinement : Les chevaux seront dans leur hébergement habituel (box individuel), auront une litière adaptée, disposeront de foin, d'aliments concentrés et d'eau à volonté. Aucun animal ne sera isolé pour les prélèvements et ceux-ci seront réalisés par les vétérinaires de la structure, qui connaissent individuellement les animaux. En cas d'agitation trop importante ou de signes excessifs de nervosité, l'animal sera sorti du dispositif expérimental.

12049 Chez l'homme la rate est l'organe intra-abdominal le plus souvent lésé lors des traumatismes abdominaux fermés. En cas d'hémorragie, la chirurgie immédiate avec ablation de l'organe est indiquée, mais chez les patients stables hémodynamiquement (rythme cardiaque, pressions artérielle et veineuse), un traitement non chirurgical avec embolisation artérielle permet d'améliorer le taux de sauvetage de l'organe tout en évitant les complications post-opératoires associés et réduit également le risque d'hémorragie secondaire. L'embolisation consiste à guider un cathéter dans les vaisseaux jusqu'au site hémorragique puis injecter un produit qui va occlure les artères responsables du saignement. On utilise fréquemment des particules de gélatine résorbables pour boucher les vaisseaux.

Les agents d'embolisation sont des dispositifs médicaux dont la mise sur le marché est soumise à l'obtention du marquage CE pour l'Europe et l'obtention d'une autorisation de la Food and Drug Administration pour les Etats-Unis.

L'objectif du projet est d'évaluer l'efficacité de particules d'embolisation résorbables ou non résorbables à arrêter un saignement (hémostases) induit de façon chirurgicale dans la rate chez le porc.

Les essais réalisés feront partie d'un dossier de marquage CE soumis à un Organisme Notifié européen et d'un dossier d'équivalence pour la soumission à la Food and Drug Administration américaine.

L'étude est comparative, c'est-à-dire qu'elle compare deux types de particules de gélatine résorbables à des particules polymériques non résorbables déjà disponible sur le marché et administré selon la même procédure.

L'étude portera sur un nombre maximum de 30 animaux. Les animaux étudiés dans ce projet proviennent de centres agréés et sont nés/élevés en captivité.

La présente demande décrit l'induction de lésions hémorragiques de la rate chez le porc, le traitement des lésions créées par embolisation artérielle et l'évaluation de l'efficacité du traitement par imagerie et histologie.

Principe des 3R :

- Remplacement : Les études préliminaires de dégradation et de cytotoxicité des matériaux constitutifs du dispositif peuvent être réalisées in vitro sur des cultures de cellules. Les essais concernant l'efficacité ou les effets locaux du traitement ne peuvent en revanche être effectués que sur des modèles in vivo, se rapprochant le plus possibles des conditions finales d'utilisation des produits.

- Réduction : L'estimation du nombre d'animaux utilisé est principalement basée sur le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente des données et limiter la variabilité inter-individus. Ce nombre est au minimum de 3 animaux par groupe d'étude (Norme ISO-10993-6). Quand cela est possible, les données de groupes contrôle sont constitués par des groupes d'animaux pour lesquels ces données sont déjà disponibles.

•Raffinement : La procédure d'induction d'hémorragie et d'embolisation splénique est réalisée sous anesthésie générale. Un protocole de suivi des animaux et de prise en charge de la douleur, avec évaluation quantitative des paramètres de suivi pour définir le point limite, sont utilisés afin de réduire au maximum la douleur et la souffrance animales.

12050 Les tumeurs neuroendocrines (TNE) du pancréas sont rares et généralement d'évolution lente sur plusieurs années. Malgré les progrès de l'imagerie morphologique notamment l'IRM, au diagnostic presque 1 patient sur 2 présente des lésions métastatiques. Le foie est le premier organe à être envahi et son atteinte conditionne le pronostic. Les TNE sont un type particulier de tumeurs car elles possèdent des récepteurs à la somatostatine (hormone inhibitrice de l'hormone de croissance) ayant permis le développement de techniques d'imageries nucléaires spécifiques. La tomographie par émission de positon (TEP) consiste à injecter un traceur dont on connaît les propriétés biologiques pour obtenir une image par la présence d'une cible moléculaire. Le traceur moléculaire le plus couramment utilisé est le 18FDG (analogue radiomarké du glucose) qui permet d'obtenir une image de tous les tissus consommant du glucose (dont les tumeurs) mais qui est peu spécifique. C'est dans ce contexte qu'a été développé la TEP au 68Ga-DOTATOC, qui est un analogue radiomarké de la somatostatine, qui se fixe donc exclusivement sur les récepteurs à la somatostatine et qui est donc très spécifique. Cette modalité a d'abord été associée au scanner (TEP/TDM) puis plus récemment à l'IRM (TEP/IRM) pour en renforcer sa sensibilité. Notre projet consiste à développer un modèle de souris auxquelles nous grefferons des cellules de TNE pancréatique au niveau hépatique par voie intraportale pour étudier la détectabilité des métastases de TNE en TEP/TDM au 68Ga-DOTATOC et au 18FDG. Pour ce faire nous aurons besoin de 20 souris pour calibrer le modèle puis de 30 souris nude pour le projet en soit. Les différentes souris auront les deux techniques d'imagerie permettant une réduction du nombre d'animaux car il ne sera pas nécessaire d'effectuer une mise à mort des souris après chaque imagerie. Pour respecter la règle des 3 R, les souris sont hébergées par cage de 5 avec de petits bouts de papier leur permettant de se cacher et de faire un « nid ». Afin de gérer au mieux la douleur prévisible des animaux, les souris sont observées quotidiennement selon la fiche de suivi en pièce jointe qui permet de déterminer le palier de douleur. Le traitement analgésique sera mis en place en accord avec le palier de douleur observé.

12051 La radiothérapie est la thérapie ciblée permettant de traiter de façon curative des formes avancées de cancer. Plus d'un patient sur deux en bénéficie. L'efficacité de la radiothérapie s'explique par la mort des cellules tumorales qui dépend de la dose. Mais l'efficacité anti tumorale est plus complexe et dépend aussi du microenvironnement tumoral, avec qui les cellules tumorales communiquent en permanence. En effet grâce à la reprogrammation de leur métabolisme, les cellules cancéreuses entrent en symbiose avec leur microenvironnement, améliorent leur capacité de réparation et échappent à l'immunosurveillance. Dans la majorité des cas, le métabolisme mitochondrial est crucial pour la tumorigenèse (mécanismes permettant le développement et le maintien des cellules cancéreuses) et la réponse tumorale aux effets des agents anticancéreux (chimiothérapie, radiothérapie). Etant donné que presque toutes les protéines mitochondriales sont codées par l'ADN nucléaire et importées dans l'organelle, les machineries d'import mitochondriales ont évolué afin de répondre aux besoins de la cellule, particulièrement pour la cellule cancéreuse. L'objectif de ce projet est d'étudier l'impact de la perturbation du complexe d'import mitochondrial sur la tumorigenèse et la réponse à l'irradiation.

Pour réaliser ce projet, des cellules tumorales humaines (HCT116) plus ou moins modifiées au niveau de leur système d'import mitochondrial seront injectées en sous-cutané dans le flanc droit de souris immunodéficientes BALB/C Nude. Ce modèle nous permet de mimer la formation de tumeurs primaires. Dans le but de caractériser au mieux la réponse des cellules tumorales dans notre modèle, 3 procédures seront réalisées :

- 1) détermination de la quantité optimale de cellules à injecter par voie sous-cutanée ;
- 2) détermination de la dose d'irradiation pertinente (irradiation totale de la tumeur) ;

3) effet de la perturbation de la machinerie d'import mitochondriale sur la tumorigenèse et la réponse à l'irradiation.

Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 750.

La souris est l'animal le plus utilisé dans le domaine de la recherche préclinique en oncologie, fournissant des résultats qui ont permis à de nombreux traitements d'être testés chez l'homme avec le moins de risque et le plus de chance de réussite. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Un suivi pondéral et clinique régulier des animaux (mesure de la masse inclus) sera réalisé. Une attention particulière sera portée au respect des points-limites adaptés fixés (taille limite de la masse, impact sur la locomotion). Les animaux étant immunodéprimés, ils seront hébergés dans des conditions maximales de protection et leur manipulation se fera au maximum sous hotte. Si les animaux contractent des infections ou tombent gravement malades, ils seront euthanasiés. L'impact sur la capacité des souris à satisfaire leurs besoins physiologiques et éthologiques sera limité au strict minimum en enrichissant leur environnement par du coton ou des nids en carton et en leur permettant de vivre en groupes de 2 à 5 souris. Des mesures seront prises pour mettre fin dans les délais les plus brefs à toute anomalie ou à toute douleur, toute souffrance, toute angoisse ou tout dommage durable constatés qui pourraient être évités en définissant des points limites précis et adaptés. L'euthanasie des animaux sera effectuée par dislocation cervicale précédée d'une anesthésie avec de l'isoflurane, en limitant le plus possible la douleur, la souffrance et l'angoisse des souris, par une personne compétente de l'établissement utilisateur.

12052 L'iléus postopératoire (IPO) est un ralentissement ou un arrêt du transit qui survient traditionnellement après environ 30% des chirurgies colorectales de résection. Cette complication reste un véritable problème de santé publique puisque non seulement elle augmente la durée d'hospitalisation et le coût de la prise en charge des colectomies réalisées, mais en plus, puisqu'elle est associée à des complications propres de la chirurgie telles que les fistules anastomotiques, les pneumopathies d'inhalation ...

Afin de réduire encore l'incidence des iléus postopératoires, les chercheurs ont proposé plusieurs éléments au sein de la réhabilitation améliorée après chirurgie. Ainsi, l'acupuncture, la stimulation vagale ou encore la stimulation tibiale postérieure permettraient de réduire significativement l'incidence des IPO sans les réduire à 0.

Lors d'une précédente étude, nous avons développé un modèle d'IPO chez la souris. Notre unité étudie les fonctions clefs du tube digestif, i.e. la fonction de barrière de la muqueuse intestinale et la motricité intestinale par ex. La littérature suggère que, dans la phase humorale de l'iléus, on observe une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale. Nous souhaitons à présent évaluer les effets d'un facteur glial, la prostaglandine I2 (PGI2) ainsi que de deux compléments alimentaires sur la reprise du transit intestinal et l'apparition d'un iléus.

Tout en tenant compte du principe des 3R (limitation des effectifs autant que possible,, raffinement des conditions d'hébergement des souris en ajoutant des igloos ou des tunnels dans les cages leur permettant de jouer, de se cacher, raffinement des expérimentations lors de la chirurgie en mettant des anesthésiques et de l'analgésie ; il n'y a pas d'alternative au remplacement), nous comparerons la reprise du transit gastro-intestinales en condition traitée ou non suite à une manipulation chirurgicale. Les expériences seront reproduites 3 fois de manière indépendante et ce projet nécessitera 324 animaux (souris C57Bl6) maximum.

12053 Les myosites regroupent un ensemble de maladies graves caractérisées par une faiblesse musculaire, une élévation sérique des enzymes musculaires et la présence dans le muscle squelettique d'un infiltrat cellulaire inflammatoire. Cliniquement ces maladies peuvent se manifester de façon très différente d'un individu à l'autre. On distingue ainsi plusieurs formes de myosites et parmi elles la dermatomyosite qui associe des atteintes musculaires et cutanées. Des auto-anticorps (aAc) dirigés contre la protéine TIF1 sont retrouvés dans le sang des patients et ont un

intérêt diagnostic. Cependant, la méconnaissance des processus physiopathologiques conduisant à la survenue des dermatomyosites est un frein au diagnostic et à la mise en place d'une thérapeutique adaptée. L'évaluation du rôle de ces auto-anticorps dans les processus physiopathologiques permettra la mise en place d'outils thérapeutiques plus adaptés et de potentiellement réduire les effets secondaires des thérapies actuellement utilisées. Notre laboratoire s'intéresse donc au rôle pathogène de ces anticorps dans la maladie comme nous l'avons démontré pour d'autres anticorps dans les myosites dites nécrosantes au cours d'une étude précédente. L'injection d'anticorps de malades et de la protéine TIF chez la souris permettra d'évaluer leur rôle dans le développement d'une maladie musculaire et ou cutanée.

Les résultats obtenus au cours d'une étude antérieure menée dans le laboratoire sur un autre modèle murin de myosite, nous permettent de mettre en place la procédure expérimentale en respectant le concept des 3R. Le nombre d'animaux nécessaires est de 64. Il est réduit au minimum en tenant compte de la variabilité des mesures de la force musculaire et de l'évaluation de la locomotion. Une échelle de gravité des symptômes observés a été établie et permet de déterminer un point limite dans l'ensemble des expériences. Elle permettra d'évaluer la douleur des animaux et de mettre en place une procédure visant à la limiter. Enfin, l'ensemble des expériences sera réalisé dans une animalerie agréée, où les conditions d'hébergement sont contrôlées : température, hygrométrie, cycle jour/nuit, change et nourriture. Les animaux seront euthanasiés par dislocation cervicale en fin de protocole.

12054 La restauration de la fertilité chez des hommes souffrant d'une altération de la production de spermatozoïdes et la préservation de la fertilité chez des jeunes garçons pré-pubères atteints de cancer sont des enjeux de santé publique importants. Malgré les progrès de la médecine, les thérapies anticancéreuses pédiatriques restent connues pour leurs effets toxiques sur les spermatozoïdes pouvant entraîner une stérilité définitive. Alors que chez l'adulte on peut proposer de congeler des spermatozoïdes avant d'engager le traitement pour préserver sa fertilité, ce n'est bien entendu pas possible chez l'enfant. La seule mesure de préservation actuellement envisageable pour ces garçons est alors de procéder à un prélèvement et une cryoconservation de tissu testiculaire, sans garantie que les progrès scientifiques futurs permettront de restaurer leur fertilité dans le cadre d'un projet parental assisté médicalement. Aucune de ces techniques de restauration de la fertilité n'est actuellement disponible chez l'Homme. Dans ce contexte, afin de pouvoir traiter ces patients, des technologies innovantes de culture de cellules reproductrices mâles ont été développées. Elles permettent, à partir de cellules mâles encore immatures prélevées dans les testicules, de former des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes ainsi obtenus, pourraient être utilisés dans le cadre d'une fécondation in vitro pour avoir un enfant. Cependant, le bon fonctionnement de ces spermatozoïdes au moment de la fécondation et durant le développement de l'embryon jusqu'à la naissance n'a pas été évalué ainsi que les conséquences sur la santé des individus.

L'objectif de ce projet vise, chez la souris et la ratte (1), à connaître la capacité fonctionnelle des spermatozoïdes formés en culture à déclencher, au moment de la fécondation, des oscillations calciques nécessaires à la formation de l'œuf et à son développement et (2) à obtenir des souriceaux et des ratons à l'aide de techniques de fécondation in vitro. Des ovocytes seront fécondés in vitro par la technique dite de l'ICSI (intra cytoplasmic sperm injection) avec des spermatozoïdes formés en culture. Nous enregistrerons et analyserons les réponses fonctionnelles calciques. En présence de faible réponse calcique, les gamètes parentaux seront activés par des procédés in vitro d'activation calcique artificielle pour obtenir un développement in vitro. Puis nous transférerons des œufs dans des femelles receveuses et nous enregistrerons le taux de naissance et la croissance des animaux obtenus.

Ce travail devra permettre d'évaluer les conditions de maturation des spermatozoïdes en culture, de trouver des conditions de fécondation in vitro efficaces pour favoriser l'obtention d'individus, et ainsi de confirmer la possibilité de l'utilisation de cette technologie comme piste thérapeutique.

Ce projet sera réalisé chez la souris et la ratte, il nécessitera l'utilisation de 612 animaux au total sur cinq ans. Leur nombre a été réduit au maximum tout en permettant d'obtenir une estimation

statistique solide. Seuls des animaux peuvent être utilisés dans le cadre de cette étude pour obtenir des individus à partir de nouvelles pratiques de fécondation in vitro. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance et limiter tout stress lors des interventions sur les animaux. Le suivi quotidien des animaux hébergés dans un environnement enrichi (papier ouate) et l'application de critères d'arrêt du suivi des animaux expérimentaux permettent de garantir le bien-être des animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance et de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie, en accord avec la structure du bien-être animal de l'installation expérimentale.

12055 La sclérose en plaque (SEP) est une maladie inflammatoire chronique du système nerveux central (SNC) et représente la cause la plus fréquente du déficit neurologique acquis chez les jeunes adultes. Cette maladie est caractérisée par une destruction de la myéline (la gaine isolante permettant une communication rapide entre les neurones) qui entraîne une disparition progressive des neurones avec pour conséquence un déficit neurologique irréversible. Il est donc important de stimuler la réparation de la myéline pour minimiser les effets de la maladie.

Les lésions provoquées par la SEP se retrouvent dans les fibres nerveuses du cerveau et de la moelle épinière. La réparation des lésions par l'administration ciblée de molécules thérapeutiques représente donc un défi majeur pour les médecins.

Cette nouvelle approche thérapeutique est mise en application par une technique qui guiderait les molécules d'intérêt thérapeutique jusqu'au niveau de la lésion. Dans notre projet, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont modifiées ex vivo à l'aide d'un vecteur lentiviral incluant le gène thérapeutique Sémaphorine 3F. Ces CSH ont la capacité à se différencier in vivo en cellules microgliales pouvant sécréter la molécule Sémaphorine 3F et migrer vers les lésions de la moelle épinière. Dès lors, les molécules Sémaphorine 3F, ainsi libérées, pourront recruter des cellules progénitrices des oligodendrocytes (CPOs) qui à terme répareront les lésions par un mécanisme de remyélinisation. Le but étant de favoriser les processus de réparation par les précurseurs (CPOs), par l'induction d'une surexpression de la molécule Sémaphorine 3F.

Cette étude ne peut être réalisée que sur un organisme entier vivant car aucun dispositif in vitro ou modèle in silico ne peut reproduire la complexité des mécanismes neuronaux. Le modèle rongeur a été choisi et permettra d'évaluer le potentiel de cette thérapie pour la réparation de la myéline.

Le projet prévoit d'utiliser 960 rongeurs, nés et élevés dans des établissements agréés. Leur nombre a été réduit à un minimum nécessaire pour permettre l'interprétation des résultats par des tests statistiques.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe de vétérinaire. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus, et dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages, enrichies de modules permettant de diversifier leurs activités, et sont observés au quotidien par une équipe en charge de leurs soins.

12056 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comprennent principalement la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces maladies résultent d'une inflammation chronique d'une partie du tube digestif dont les causes, probablement multifactorielles, ne sont pas clairement connues.

La maladie de Crohn peut atteindre tous les segments du tube digestif, mais les atteintes sont généralement iléo-cæcales et segmentaires. Son évolution se fait le plus souvent par poussées séparées de périodes de rémission plus ou moins longues. Les symptômes les plus fréquents sont l'apparition de diarrhées avec présence de sang ou de glaires, des douleurs abdominales et une perte de poids accompagnée d'une détérioration de l'état général. La rectocolite hémorragique est

également une pathologie inflammatoire chronique. Elle se distingue de la maladie de Crohn par la localisation exclusive des lésions au niveau du côlon. Les symptômes associent des selles fréquentes, des émissions de glaires sanglantes, des faux besoins et des douleurs abdominales.

En France, la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique touchent chacune environ 1 personne sur 1000, soit plus de 100 000 cas en tout.

D'un point de vue thérapeutique, on distingue les traitements des poussées, visant à mettre le plus rapidement possible le tube digestif « au repos » des traitements d'entretien visant à maintenir le plus longtemps possible cette rémission. Différents types de traitements sont classiquement utilisés (salicylés, corticoïdes, immunosuppresseurs, antibiotiques, anticorps anti-TNF α) mais ils n'apportent pas à ce jour une réponse totalement satisfaisante, leur utilisation peut être accompagnées d'effets secondaires importants et ils ne sont pas efficaces chez tous les patients.

Compte tenu des éléments évoqués plus haut, il apparaît clairement que les efforts engagés pour mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant à la fois de mieux contrôler les poussées et d'en diminuer le nombre, doivent être poursuivis. Ces développements passent par la réalisation de tests effectués sur des modèles animaux aussi prédictifs que possible. Dans cette optique, différents modèles animaux ont été développés chez le rongeur et notamment, le modèle d'inflammation colique induit par l'administration de dextran sulfate sodium (DSS) chez le rongeur compte parmi les modèles les plus utilisés et fait l'objet du présent projet. Cependant, compte tenu de cibles thérapeutique spécifiquement exprimées chez certaines espèces, le modèle de colite induit par le DSS (dont le protocole réalisé chez la souris a déjà été accepté par le comité d'éthique et le ministère de la recherche en 2013) a été adapté dans notre laboratoire chez le rat. Nos données préalables réalisées avec des traitements de référence utilisés en clinique, comme la sulfasalazine, nous ont également permis un calcul de la taille des cohortes d'animaux nécessaires aux tests d'efficacité d'une molécule candidate, permettant ainsi de limiter le nombre d'animaux utilisés sans pour autant diminuer la puissance de nos analyses. Ainsi, un personnel qualifié évaluera cliniquement les animaux tous les jours et un certain nombre de mesures a été mis en place afin de minimiser toute souffrance et respecter le bien être des animaux. Au niveau du raffinement, lors de l'induction de l'inflammation colique, des croquettes de nourriture sont ajoutées dans la litière afin de faciliter l'accès à la nourriture pour limiter une perte de poids trop importante. A la fin de l'expérience, les rats sont anesthésiés avec une anesthésie gazeuse (isoflurane 4%) pour anticiper toute souffrance lors des prélèvements de sang terminaux et de la mise à mort de l'animal sous anesthésie gazeuse pour effectuer le prélèvement de colon post mortem. Les colons seront alors mesurés et pesés pour déterminer l'efficacité des candidats médicaments et des études histologiques pourront alors être effectuées.

Si le point limite est atteint au cours du protocole, l'animal concerné sera évalué cliniquement par au moins deux personnes qualifiées et sera mis à mort sans souffrance selon les normes éthiques en vigueur. Pour tester l'efficacité d'un candidat médicament sur une série expérimentale, incluant un groupe sain (contrôle négatif), un groupe induit par le DSS et traités avec le véhicule (contrôle positif), 3 groupes tests (1 composé candidat testé à 3 doses), et un groupe incluant un composé de référence, le nombre total d'animaux pour une série expérimentale est de : 60 animaux ; pour un total de 10 séries sur 5 ans, soit 600 animaux.

12057 La myéline axonale permet un traitement neural rapide et efficace. Tout au long de la vie, les cellules précurseurs génèrent de nouveaux oligodendrocytes, qui jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie des réseaux neuronaux. Les oligodendrocytes nouvellement générés améliorent l'apprentissage moteur et renforcent les voies actives. Cependant, la dynamique du remodelage de la myéline dans différentes conditions micro-environnementales reste mal comprise. En particulier, l'expérience sensorielle et l'entraînement pourraient être un moyen d'améliorer la résistance aux événements démyélinisants pathologiques et d'améliorer la rémission fonctionnelle dans la sclérose en plaques. Néanmoins, le premier pas vers de nouvelles stratégies thérapeutiques consiste à rendre visibles les événements myélinisants cellulaires et subcellulaires chez le sujet vivant sur plusieurs semaines. Nous proposons d'utiliser la souris comme modèle pour plusieurs causes, (A) les connaissances du système nerveux central de la souris permettent de partir d'une base assez

avancée et évité éviter la mise au point, (B) l'existence des lignées transgéniques qui marquent spécifiquement nos cellules d'intérêt en les rendant visibles et traçables facilite beaucoup notre étude, (C) les interactions entre les cellules du système nerveux central chez la souris sont en grande partie conservées chez les humains ce qui facilite la compréhension des pathologies. Ces trois causes rendent la souris un très bon modèle, irremplaçable pour notre étude. Nous proposons donc de mettre en place une technique d'imagerie optique pour caractériser la gaine de myéline autour des axones spinaux dorsaux avec microscopie bi-photonique pour visualiser le cytoplasme neuronal et l'activité neuronale chez des souris vivantes. Dans ce projet, nous utiliserons une fenêtre spinale unique pour permettre l'imagerie longitudinale dynamique des mêmes neurones sur plusieurs semaines. Nos techniques d'imagerie non-invasives, l'hébergement dans des cages enrichies et les traitements antalgiques vont augmenter le taux de raffinement et de réduction car nous allons suivre une souris à tous les temps et une même souris participera longitudinalement à toute l'étude. Dans toutes nos procédures expérimentales, nous allons utiliser un mélange de Kétamine (120mg/kg) / Xylazine (12mg/kg) pour anesthésier les souris en plus nous allons ajouter de la buprénorphine (0.05mg/kg) pour la procédure n°7. Pendant les procédures expérimentales (sauf la procédure n°2 et 7) les souris seront sur des tapis chauffants ou dans une petite chambre chauffée à 30°C. Ensuite, après chaque procédure (sauf la procédure n°7) les souris seront injectées par une solution d'anti-inflammatoires (dexaméthasone (0.2mg/kg) et rimadyl (5mg/kg) le jour de la chirurgie puis tous les deux jours pendant 10 jours et elles seront suivies par une évaluation du bien-être (voire annexe) pour définir leurs états. Nous mettrons en place un enrichissement sensoriel qui consiste à mettre dans les cages des objets avec différentes textures et matières pour renforcer la plasticité de la myéline et étudierons l'impact thérapeutique de cette plasticité sur un modèle de démyélinisation permettant d'accéder aux mécanismes cellulaires mis en jeu. Les connaissances nouvellement acquises seront enfin utilisées pour caractériser la démyélinisation, dans le but d'améliorer la capacité diagnostique de l'imagerie chez les patients atteints de la Sclérose en Plaque et de proposer des stratégies thérapeutiques innovantes ciblant les oligodendrocytes. Pour répondre à toutes ces questions biologiques, ce projet va utiliser en total 210 souris divisés en 14 lots.

12058 Nous étudions les mécanismes de la réponse immunitaire provoquée par l'endommagement du tissu pulmonaire et pouvant conduire à la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) ou à la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) caractérisée par une bronchite chronique et/ou un emphysème pulmonaire.

La fibrose pulmonaire est une maladie progressive, souvent fatale caractérisée par des épisodes séquentiels d'inflammation aiguë accompagnée d'un endommagement de l'épithélium alvéolaire et du tissu pulmonaire. Ceci se traduit par une réparation tissulaire excessive et par une prolifération anormale des fibroblastes du tissu pulmonaire. La fibrose pulmonaire aboutit à la perte progressive de fonction respiratoire avec une survie moyenne de 3 ans après les premiers signes de fibrose. A ce jour, il n'existe pas de traitement efficace contre une fibrose établie. De nombreuses maladies sont caractérisées par une fibrose tissulaire comme l'asbestose/amiantose, la silicose, la sarcoïdose, les maladies de métiers associées à l'inhalation de petites particules minérales ou organiques. Dans 50% des cas, la fibrose pulmonaire est d'origine inconnue et est alors appelée fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires de cette pathologie permettrait de progresser vers des pistes thérapeutiques.

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est un problème majeur de santé publique puisque, avec le tabagisme comme facteur de risque principal, elle deviendra en 2020 la troisième cause de décès dans le monde. Les patients atteints de BPCO présentent une inflammation chronique des bronches, une hypersécrétion de mucus et dans les cas les plus graves, un emphysème qui correspond à la destruction des parois alvéolaires pulmonaires. Lors de cette maladie, une limitation progressive et irréversible des échanges gazeux est observée. La cause de cette maladie est bien connue et sa progression pourrait être arrêtée par l'arrêt du tabagisme. Malheureusement les propriétés addictives du tabac empêchent un arrêt précoce de la cigarette en début de maladie. En outre, l'inflammation peut persister si l'arrêt du tabagisme a lieu à un stade

avancé de la BPCO et rester présente pendant des décennies. Les traitements actuels ont une certaine efficacité contre l'inflammation chronique mais sont incapables de réparer les poumons lors de l'emphysème. Il y a donc un besoin urgent en traitements plus efficaces et spécifiques de la BPCO.

Nous avons développé des modèles murins de fibrose pulmonaire (instillation de bléomycine ou BLM) et d'emphysème pulmonaire (instillation d'une élastase, l'élastase pancréatique de porc ou PPE) dans les voies respiratoires, afin d'étudier les mécanismes de ces pathologies chez la souris en utilisant des souris génétiquement modifiées. La BLM provoque une inflammation des poumons observable 24h après l'instillation qui se traduit par le développement rapide d'une fibrose pulmonaire 2 à 3 semaines après. Les souris sont donc sacrifiées rapidement à 24h et 2 ou 3 semaines après l'instillation de BLM. La PPE provoque également une inflammation conduisant à un emphysème au bout de 2-3 semaines. Nous nous efforçons de réduire le nombre d'animaux en expérimentation malgré la contrainte d'une validation statistique de nos résultats. Les méthodologies utilisées sont raffinées avec une optimisation de chaque expérience en termes de prélèvements effectués et de paramètres mesurés et récupération de plusieurs tissus afin de réaliser, avec les mêmes animaux, des expériences ex vivo et in vitro. Nous suivons également des critères d'interruption des expériences, bien définis. Nous utilisons d'autres techniques afin de remplacer les modèles animaux, en particulier nous effectuons des expériences in vitro en utilisant des lignées cellulaires établies d'origine murine ou humaine. Pour ce projet nous prévoyons d'utiliser 3924 souris.

Dans un souci de bien-être des animaux, des anesthésiques/analgésiques seront utilisés pour réaliser certains types de traitements. De plus, la surveillance des animaux est réalisée quotidiennement et consiste en l'observation de l'aspect général de l'animal, de son comportement et de sa mobilité.

Dans certains cas, la maladie s'accompagne d'une perte d'appétit, d'une perte de poids et d'une fatigue plus ou moins importante. Pour compenser la perte de poids, un enrichissement alimentaire pourra être fourni aux animaux.

Si des animaux présentent un début de signes de souffrance (point limite prédictif : score de 4 décrit en paragraphe 3.4.13), ils seront mis à mort. Les antalgiques ne sont pas administrés car ils peuvent influencer les résultats expérimentaux en interférant dans le système immunitaire.

12059 Titre du projet : Etude de molécules anticancéreuses de type immune checkpoints inhibiteurs chez des souris immunocompétentes.

Durée du projet : 5ans

Mots clés : modèles de cancer, sensibilité au traitement, nouveaux traitements

Type de recherche : recherche appliquée

Buts du projet : Un nombre croissant d'observations réalisées chez les patients suggèrent que le système immunitaire joue un rôle important dans certains types de traitements du cancer. Ce projet vise à étudier différentes nouvelles molécules pouvant avoir une activité anticancéreuse grâce au système immunitaire. L'utilisation de souris immunocompétentes, c'est à dire dont le système immunitaire est intact, nous permettra de déterminer le rôle du système immunitaire dans l'effet antitumoral. Ce rôle peut être particulièrement important dans le cas de traitements par des anticorps.

Retombées attendues : Cette étude permettra de mettre au point de nouveaux traitements impliquant le système immunitaire

Type d'espèces et nombres d'animaux : cette étude sera réalisée sur souris immunocompétentes avec un effectif total prévu de 3678 souris

Prise en compte des 3 R : a) remplacement : cette étude cherche à étudier l'effet du système immunitaire sur la tumeur et doit donc être réalisée sur un organisme entier ; b) réduction : la mise au point du modèle sera faite sur le nombre minimal de souris nécessaire et la confirmation des

résultats sera réalisée sur un nombre minimal d'animaux permettant de conclure de façon fiable ;
c) raffinement : Afin de respecter le bien-être animal, les souris sont dans des cages avec un milieu enrichi avec du coton pour qu'elles se fassent un nid. Prise en compte de la souffrance de l'animal : toutes les précautions nécessaires seront prises pour détecter et minimiser la souffrance des animaux dans le cadre de ce projet. Les points limites sont établis.

12060 Les modèles animaux permettent l'étude des effets positifs et négatifs des drogues anticancéreuses à l'échelle de l'organisme. Ces études précliniques sur l'animal permettent la validation de thérapies plus efficaces pouvant être envisagées pour le traitement des patients humains.

Les études proposées visent à déterminer les paramètres pharmacocinétiques, c'est-à-dire la durée de présence dans le sang de l'animal, de nouvelles molécules dont certaines sont destinées à devenir des médicaments en médecine humaine. Connaître les paramètres pharmacocinétiques d'un composé permet de déterminer sa fenêtre d'activité thérapeutique et donc de déterminer la posologie ayant le meilleur index thérapeutique.

Les premiers essais des candidats-médicaments de cette étude ont été réalisés sur des cellules en culture, mais une compréhension plus poussée nécessite à présent la réalisation d'expérimentations sur un modèle animal reproduisant autant que possible la pathologie humaine. Le choix se porte sur le rat qui constitue un bon modèle pour les études pharmacocinétique sur petit animal. En effet, la nécessité de prélèvements sanguins répétés justifie le choix du rat plutôt que d'un autre rongeur.

Toutes les démarches et réflexions de l'étude ont été faites dans le but de réduire au maximum le nombre de rats utilisés. Sur 3 ans, la demande s'élève à 120 rats.

Nous prendrons toutes les précautions nécessaires afin que nos animaux soient les moins stressés possible et veillerons quotidiennement à leur bien-être. Un traitement analgésique est prévu en cas de douleur détectée en sous-cutané, ainsi qu'enrichissement de l'environnement d'hébergement (objet à grignoter : bâtonnets, cachettes : rouleau), cage à 2/3 rats pour permettre la socialisation.

12061 Les syndromes septiques se caractérisent par un intense syndrome inflammatoire, responsable d'une perturbation majeure de l'homéostasie de l'organisme. La dysfonction de l'endothélium peut être particulièrement marquée, se traduisant par une altération des flux microcirculatoires et une fuite des fluides plasmatiques vers l'interstitium, induisant un syndrome œdémateux corrélé à la gravité de l'état.

Les mécanismes impliqués dans cette fuite capillaire sont actuellement peu connus.

Une hyperproduction des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est observée, possiblement responsables d'un relâchement des jonctions intercellulaires.

Une autre hypothèse pourrait concerner l'implication du système lymphatique, impliqué dans le drainage des fluides interstitiels, et dont le fonctionnement en condition septique n'est pas connu.

Par ailleurs, l'administration de grande quantité de solutés de remplissage au cours du sepsis est la première ligne de traitement en cas d'état de choc. Cependant, une quantité trop importante pourrait majorer la fuite capillaire et donc aggraver le pronostic.

Une stratégie consisterait à utiliser des solutés à fort pouvoir oncotique, réduisant ainsi le volume administré tout en conservant le pouvoir de remplissage vasculaire.

De nombreuses études montrent l'effet délétère des produits synthétiques hyper-oncotique (HEA, dextrans...) sur le pronostic au cours du sepsis. Les travaux de recherche se tournent donc sur l'utilisation de produits cristalloïdes, sans macromolécules synthétiques, tels que le sérum salé hypertonique ou le bicarbonate de sodium molaire. Un travail récent met en évidence une amélioration du pronostic, de la micro et macrocirculation et de la balance hydrique par l'administration de solutés de lactate de sodium molaires (11,2%) dans un modèle porcin endotoxinique, en comparaison avec le NaCl 0,9% classique mais également vis-à-vis du bicarbonate de sodium molaire. Les raisons de cette amélioration ne sont pas élucidées.

Nous nous proposons donc d'étudier dans un modèle animal chez le rat Wistar l'impact de ce soluté sur la perméabilité capillaire, la fonction cardio-vasculaire, la dysfonction microcirculatoire et le système lymphatique.

Ce travail sera subdivisé en deux modèles de sepsis :

- un modèle de sepsis par ligature caecale et ponction, permettant de mimer au mieux les situations cliniques de sepsis observées chez l'Homme,
- et un modèle par injection intra-péritonéale de lipopolysaccharide bactérien (LPS) permettant d'induire rapidement une inflammation puissante et reproductible d'un animal à l'autre, facilitant l'exploration des mécanismes physiologiques sous-tendant les potentiels effets du traitement.

Nous réaliserons 4 groupes par procédure (Sham, Contrôle NaCl, Bicarbonates de sodium, lactates de sodium). Nous examinerons les modifications de la fonction cardiovasculaire grâce la réalisation d'une échocardiographie et la prise de la pression artérielle non invasive toutes les 30 minutes. La fonction microcirculatoire sera étudiée grâce à la vidéomicroscopie in vivo et par le test de perméabilité capillaire au bleu d'Evans. Des analyses biomoléculaires de marqueurs de la perméabilité capillaire seront réalisées sur plasma et tissus.

Un total de 160 animaux (soit 80 pour la ligature caecale et 80 pour le LPS) serait nécessaire et suffisant. Afin de limiter au maximum les variations liées aux expérimentations chirurgicales, les procédures seront standardisées et réalisées par le même opérateur préalablement formé à la procédure.

Dans l'objectif de répondre à la règle des 3R dans ce programme de recherche nous œuvrons pour :

1. Réduire le nombre d'animaux par l'utilisation des méthodes non invasives (échocardiographie et pression artérielle) permettant de répéter les analyses sur le même animale, mais aussi grâce à l'utilisation de tests statistiques appropriés. Nos expériences dans le laboratoire ont démontré que des groupes de n=20 sont nécessaires dans le modèle de sepsis (mortalité post-opératoire estimée à 30%). Ce nombre évalué par des tests statistiques permettrait un effectif suffisant par groupe pour réaliser des analyses. De plus, les données obtenues chez des animaux témoins (non-opérés) ou contrôles seront réutilisées autant que possible dans des études complémentaires ultérieures
2. Raffiner, les animaux sont hébergés aux normes requises et leur milieu sera enrichi. Des points limites adaptés, une stratégie d'anesthésie et d'analgésie seront mise en place avec un suivi quotidien du bien-être animal.
3. Cette partie du projet ne peut faire l'objet de remplacement par d'autres modèles alternatifs.

Pour conclure, l'objectif principal de ce travail est d'approfondir l'impact des solutés de lactates molaires sur la fuite capillaire, la fonction lymphatique et la fonction cardio-vasculaire dans un contexte septique. Ceci permettrait d'envisager l'utilisation de ce soluté lors des états infectieux critiques chez l'Homme.

12062 L'insuffisance rénale chronique (IRC), ou maladie rénale chronique (MRC), se définit comme la perte progressive et irréversible des néphrons, unités fonctionnelles du rein, responsable d'une diminution du débit de filtration glomérulaire. Toute maladie rénale va évoluer vers une fibrose rénale irréversible qui entraîne l'IRC.

On estime que 600 millions de personnes sont atteintes de MRC soit 5% de la population mondiale. En France, la pathologie touche environ 3 millions de patients. Les taux de mortalité et la morbidité sont élevés. Les traitements les plus utilisés restent la dialyse et la transplantation rénale. Depuis l'utilisation des bloqueurs du système rénine angiotensine dans les glomérulopathies aucune approche thérapeutique n'a fait la preuve de son efficacité pour ralentir la progression de la MRC en dehors de quelques traitements dans la polykystose et le diabète. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour ralentir la progression de la MRC est essentielle, et les modèles animaux restent au cœur de la phase préclinique pour les identifier.

Notre hypothèse est que l'absence de CD146, une molécule d'adhésion endothéliale, au niveau rénal ralentira ou préviendra la progression de l'insuffisance rénale (IR) dans un modèle murin d'insuffisance rénale.

Il nécessite donc l'utilisation de modèles de souris invalidées pour le gène CD146 totalement ou au niveau endothélial chez lesquelles une insuffisance rénale chronique sera induite afin de valider nos hypothèses.

Seules les expériences considérées comme absolument indispensables seront réalisées afin d'utiliser le moins d'animaux possibles (réduction) : rédaction d'un protocole expérimental avant toute expérimentation, utilisation des statistiques lors de la conception du protocole expérimental pour une estimation préalable du nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux afin d'obtenir plus d'informations pertinentes à moindre coût en terme de "mal être" animal (raffinement). Par exemple, les animaux seront élevés dans des cages avec enrichissement du milieu. L'enrichissement mis en place consistera en l'ajout de matériaux de nidification de type « Nestlets » dans les cages, ce qui réduira l'ennui. A chaque fois que cela sera possible, des modèles in vitro seront développés à la place des modèles in vivo (remplacement). Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux pour chaque groupe, nécessaire à la réalisation d'un test statistique non paramétrique, soit un total de 80 souris. Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (visualisées par une augmentation des rythmes cardiaque et respiratoire répercutée au niveau des flancs de l'animal), si l'animal est prostré ou en retrait, si ses poils sont hérissés. Une grille d'évaluation de la douleur par score sera mise en place pour évaluer une souffrance animale éventuelle.

12063 L'insuline est une hormone essentielle, jouant un rôle central dans de nombreux dérèglements et maladies métaboliques dont le diabète de type 2 (DT2). Elle est le signal spécifique qui permet à l'organisme de baisser son taux de glucose sanguin. Un taux de glucose sanguin trop élevé est l'une des caractéristiques du DT2. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes de sécrétion de cette hormone sont importants d'un point de vue thérapeutique. La perte de sensibilité à l'insuline ou insulino-résistance est un des symptômes chez les personnes diabétiques. Elle est souvent accompagnée d'une phase de compensation durant laquelle les individus hyper-sécrètent de l'insuline. Cette hyper sécrétion induit un stress pour les cellules bêta des îlots de Langerhans, seules cellules de l'organisme capables de sécréter l'insuline.

Récemment, nous avons découvert que les cellules bêta pancréatiques dégradent l'insuline en période de jeûne afin notamment d'empêcher la libération indésirable d'insuline. Toutefois, une mauvaise régulation de cette dégradation pourrait provoquer aussi la pénurie d'insuline qui caractérise les cellules bêta pancréatiques chez les patients diabétiques. Après avoir validé notre découverte in vitro, nous souhaitons maintenant apporter la preuve in vivo du rôle de la dégradation des granules d'insuline dans le DT2. Pour ce faire, nous souhaitons utiliser un modèle de souris génétiquement modifié pour devenir diabétique avec lequel nous testerons l'effet de deux inhibiteurs pharmacologiques. Ces inhibiteurs ciblent spécifiquement deux protéines impliquées dans la dégradation de l'insuline au cours du DT2 et doivent ainsi permettre de valider notre découverte.

Remplacement :

La régulation de la glycémie nécessite la participation de plusieurs organes interdépendants (foie, îlots de Langerhans, muscles, tissus adipeux, cerveau). Ces mécanismes complexes ne sont présents que dans des organismes complexes tels que la souris.

Réduction :

Nous utiliserons un total de 42 souris. Le nombre d'animaux testé dans chaque expérience nous permettra une comparaison statistique adaptée entre les différents groupes tout en tenant compte des impératifs de réduction.

Raffinement :

Les différentes expériences seront réalisées par du personnel qualifié afin d'éviter le stress lié à la manipulation des animaux. Les chirurgies seront pratiquées sous anesthésie générale par du personnel compétent. Les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum nécessaire pour les analyses biochimiques et les volumes injectés seront adaptés au poids de chaque animal afin

de ne pas induire de stress supplémentaire. Les conditions d'hébergement des animaux respectent la directive européenne 2010/063EU. Toutefois, pour optimiser le bien être animale, les cages seront enrichies avec du coton et du carton. Sachant que l'une des conséquences directes du diabète chez ces souris est l'augmentation des mictions, un suivi quotidien de l'état de la cage sera réalisé. Les techniciens devront changer la cage dès que nécessaire en limitant au maximum d'impacter le bien-être des souris.

Les animaux seront manipulés avec des méthodes de contention adaptées par du personnel entraîné et qualifié. Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, elles seront surveillées quotidiennement pour réduire tout inconfort ou douleur qui se développerait. Un protocole analgésique est mis en place pour limiter la douleur des animaux engendrée par la chirurgie et un suivi régulier est aussi mis en place post-chirurgie pour s'assurer du bien-être des animaux. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé, après avis vétérinaire.

12064 Zeb1 (protéine de liaison à doigt de zinc/zinc-finger E-box binding protein 1) est un facteur de transcription appartenant à la famille Zeb. Après sa découverte, Zeb1 a été largement étudié pour son rôle dans le cancer. Néanmoins, il a été montré que Zeb1 était également très important dans le développement des cellules immunitaires et en particulier des lymphocytes T. Grâce à deux modèles de souris transgéniques (Cellophane et Twirler) qui portent chacun une mutation différente au niveau du gène Zeb1, il a été montré que ce facteur de transcription est impliqué de façon essentielle dans le développement d'une sous population particulière de lymphocytes T, les NKT. Le but de ce projet est de réaliser des souris « chimères de moelle osseuses », c'est à dire de remplacer le système immunitaire de souris de type sauvage par celui de nos animaux transgéniques. L'environnement des cellules immunitaires sera ainsi de type sauvage, ce qui nous permettra de tester si le défaut de développement des cellules NKT est lié à un défaut de leur environnement ou au contraire à un défaut intrinsèque à ces cellules. Ce type de projet ne peut être mené sans utiliser d'animaux car le système immunitaire est extrêmement complexe avec une multitude de cellules constamment en mouvement et organisées en un réseau tridimensionnel impossible à reproduire in vitro. Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Le nombre de souris a été calculé afin que les résultats aient une valeur statistique malgré les variations entre les animaux, tout en évitant les mises à mort inutiles. Le nombre d'animaux est donc estimé à 112 souris sur 3 ans. Tout au long du projet, nous veillerons à ce que les conditions d'élevage, d'hébergement et de soins soient les plus adaptées. Par ailleurs, les procédures utilisées dans ce projet n'occasionnent qu'une douleur et une angoisse minimales pour les animaux. Par exemple, L'angoisse et la souffrance résultant de l'injection et du prélèvement rétro-orbitale seront atténuées par anesthésie gazeuse des animaux à l'isoflurane (induction 4%). Avant l'injection et le prélèvement au sinus rétroorbitaire, un collyre anesthésique local (Tétracaïne, une goutte) sera appliqué. Dans le cas où l'œil montrerait des signes d'inflammation après l'injection, il sera soigné par l'application d'une pommade vétérinaire ophtalmique associant un corticostéroïde et un antibiotique (Fradexam).

12065 La réponse clinique à une infection grippale peut se manifester par des symptômes qui vont d'un état fébrile jusqu'à une pneumonie sévère. On observe chez l'Homme que le nombre de patients malades et le taux de mortalité sont élevés chez les enfants et les personnes âgées. Le modèle d'infection grippale chez la souris reproduit très bien les mécanismes de défense immunitaire observés chez l'Homme et son emploi permet d'étudier en détail d'une part, la réponse immunitaire développée en réponse à l'infection, et d'autre part, les gènes dont l'expression confère une plus grande sensibilité à l'individu. L'utilisation du modèle souris, pour étudier les mécanismes de la grippe, permet ainsi de caractériser finement des éléments clés de la réponse de l'hôte qui peuvent être de potentielles cibles lors d'un traitement par des médicaments. Plusieurs laboratoires ont recherché si la protéine prion pouvait jouer un rôle lors d'infections virales chez la souris. La protéine prion, est une protéine que l'on retrouve à la surface des cellules, elle est exprimée abondamment dans les neurones du cerveau et de manière plus faible dans d'autres tissus de l'organisme tels

que les reins, le cœur ou les poumons. Hormis un rôle dans la protection des neurones, la fonction biologique de cette protéine reste très peu connue.

Une étude récente a montré que des souris, chez qui la protéine prion n'était plus présente, se révélaient être plus sensibles à l'infection grippale, par comparaison aux souris témoins chez qui cette protéine l'était.

La protéine prion pourrait donc être un acteur important dans la protection contre les infections grippales.

Cette protéine appartient à une famille qui en comprend également deux autres : Doppel et Shadoo. Toutes ces protéines ont une forte similitude entre elles dans leurs structures et leurs fonctions.

Notre projet prévoit d'étudier le rôle des protéines de la famille prion dans la réponse clinique à une infection grippale.

Le modèle d'infection de la souris par le virus de la grippe est un modèle validé et utilisé dans tous les laboratoires travaillant sur le sujet. Notre protocole expérimental consiste à réaliser une infection par voie intra-nasale des souris par du virus de la grippe. Cette infection se fait pendant une anesthésie générale des animaux qui comprend également un traitement induisant une absence de douleur.

Une expérience type repose sur l'étude d'un lot de 10 animaux génétiquement modifiés et de 10 animaux témoins. Nous testerons 8 types de souris génétiquement différentes ainsi que trois souches de virus (deux souches humaines et une souche aviaire). Nous réaliserons cette expérience deux fois. Nous estimons donc utiliser 960 souris pour l'ensemble du projet qui dura 5 ans. La souche de souris témoin sera comparée à des souris chez qui les différentes protéines de la famille prion ne sont plus présentes. Nous disposons dans notre laboratoire de 8 types de souris : un type chez qui les 3 protéines sont absentes ; trois types de souris où chacune des trois protéines est absente séparément ; trois types où deux protéines de la famille sur les trois sont absentes. Nous disposons d'un dernier type de souris chez qui la protéine prion est fortement présente. L'étude de toutes ces combinaisons nous permettra de conclure sur le rôle de chacune de ces protéines. Les souris servant à notre étude sont élevées dans le cadre de nos recherches qui étudient la fonction biologique des protéines de la famille prion, elles proviennent de notre élevage. Chez ces animaux, nous explorerons, après l'infection, leur capacité respiratoire, nous caractériserons la réaction immunitaire des poumons et nous étudierons l'implication des protéines de la famille prion dans l'infection grippale. Nous nous attacherons à n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaires, c'est-à-dire des effectifs d'animaux compatibles avec une analyse statistique fiable. L'état de santé des animaux fera l'objet d'une attention particulière quotidienne, les souris seront surveillées tout au long de l'expérience et l'état pathologique sera évalué grâce à des critères cliniques stricts basés sur la perte de poids et la température corporelle. Cette évaluation permet de réagir très rapidement lorsqu'un animal présente une détresse importante. Les animaux seront hébergés par 5 dans des cages collectives. L'eau et la nourriture seront disponibles à volonté et les paramètres ambiants tels que l'humidité et la température seront contrôlés. Un enrichissement de leur milieu sera mis en place pour favoriser le bien-être des animaux et se matérialisera par du papier absorbant qui pourra être déchiqueté.

12066 La peau constitue la première ligne de défense contre les infections ou contre les agressions extérieures induites par des agents chimiques ou encore les rayons UV (coup de soleil). L'intégrité de cette barrière repose sur l'activité sentinelle du système immunitaire composé entre autres par les macrophages du derme et les cellules de Langerhans de l'épiderme. Ces cellules coordonnent de plus les capacités réparatrices des fibroblastes et des kératinocytes qui composent respectivement ces deux tissus. En cas de rupture de cette barrière, d'autres cellules immunitaires telles que les monocytes et les neutrophiles, sont recrutées depuis la circulation sanguine pour optimiser le processus de réparation tissulaire et éviter l'émergence de tumeurs cutanées telles que le mélanome.

La peau contient également un réseau dense de neurones sensoriels impliqués dans la perception du touché léger et de la douleur. De récentes études montrent également que le système nerveux

sensoriel peut influencer l'activité des cellules immunitaires et ainsi optimiser les défenses contre une agression extérieure. Notre objectif dans ce projet, sera de comprendre comment ces neurones sensoriels favorisent les capacités réparatrices de la peau suite à une lésion cutanée induite par une exposition aux rayons UV. Pour répondre à ces questions fondamentales, nous utiliserons différents modèles génétiques de souris dépourvus de certaines sous-populations de neurones sensoriels : les souris Nav1.8-DTA qui sont totalement dépourvues des neurones exprimant Nav1.8 ; les souris Nav1.8Cre-GINIP-DTR qui sont dépourvues des neurones sensoriels exprimant GINIP et enfin les souris TFAA4-KO dont les neurones sensoriels n'expriment plus le neuropeptide Tafa4. Nous étudierons l'activité des cellules immunitaires de la peau dans ces souris après exposition aux UV et les comparerons aux souris contrôles (qui n'ont aucune déficience) pour déterminer la contribution relative des différents groupes de neurones sensoriels dans l'établissement de l'inflammation, la réparation tissulaire et enfin le retour à l'homéostasie. Des expériences *in vitro* nécessitant la mise en culture de cellules immunitaires, de cellules dermiques et de neurones sensoriels nous permettront de caractériser finement les mécanismes qui sous-tendent ces interactions neuro-immunologiques.

Nous estimons que pour répondre convenablement aux réponses scientifiques soulevées, le nombre minimal total de souris nécessaires s'élèverait à 9010 animaux. Nous comptabilisons 540 souris tests par génotype (GINIP-DTR et TFAA4-KO) et 540 souris contrôle par génotype (Nav1.8-Cre = GINIP WT et TFAA4 WT de même portée, respectivement) nécessaires pour suivre en cinétique la phase inflammatoire, la phase de réparation tissulaire et le retour à l'homéostasie. Pour la mise au point des procédures, un total de 70 souris C57Bl/6j seront utilisées. Des lots de cinq souris seront constitués pour chaque condition testée afin de répondre aux exigences des tests statistiques de rang non-paramétrique (Mann Whitney). Les effectifs ont été réduits à leur minimum pour respecter la loi des 3R et permettre une robustesse statistique. Les souris ont un accès *ad libitum* à un bidon d'eau et à un régime alimentaire standard. Les souris sont hébergées par cinq en cages standard à toit ouvert (couvercle à filtre) avec de la sciure de bois utilisée comme litière, des rouleaux de coton comme matériau de nidification et de maisons de souris achetées dans le commerce et fournies pour l'enrichissement environnemental. Les souris ne seront pas logées séparément et seront libres de leur déplacement. Pour répondre à la problématique de « réduction de la douleur » imposée par la loi des 3R, les animaux seront anesthésiés avant toute procédure nécessitant selon les chartes éthiques en vigueur, soit par inhalation de gaz anesthésique vetisofluorane soit par injection d'un mélange anesthésique général. En parallèle, une observation quotidienne des animaux vigiles sera réalisée suite à l'induction d'une inflammation cutanée et consistera en une vérification du poids, de la vivacité et de l'état du pelage des animaux avant de continuer l'expérience ou non en fonction des signes vitaux observés. Au besoin et au moindre signe de dégradation de l'état général, d'autres points d'observations intermédiaires seront assurés. Une souris qui aura perdu 20% de son poids initial sera systématiquement retirée du projet. De même une modification drastique et évidente du comportement de l'animal (prostration, paralysie, arrêt du toilettage, perte de l'activité d'exploration) sera retirée de l'étude et euthanasié. Ces critères nous permettent de respecter les points limites d'expérimentation établis.

12067 Le cancer du sein est aujourd'hui le cancer le plus fréquent chez la femme. Dans les pays développés, près d'une femme sur huit sera concernée au cours de sa vie, le risque augmentant avec l'âge. Certains cancers du sein (1 sur 5 environ) sont plus agressifs, car les cellules de la tumeur surexpriment à leur surface un certain type de récepteur, le récepteur HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2). Si ces récepteurs sont en nombre trop important, la croissance cellulaire est perturbée et l'évolution de la maladie est aggravée (rechutes plus rapides, survenue de métastases et résistance aux traitements conventionnels). Ces dernières années, l'introduction de nouveaux traitements à base d'anticorps anti-HER2 tels que le trastuzumab (Herceptin®) et le conjugué anticorps-médicament ou ADC trastuzumab-emtansine (T-DM1, Kadcyla®) a considérablement amélioré la survie globale des patientes. Cependant, le T-DM1 se présente comme un mélange hétérogène d'immunoconjugués, ce qui compromet sa fenêtre thérapeutique. De plus, une résistance acquise au T-DM1 est fréquemment observée. Il est également connu que l'anticorps, dans son format complet, présente une certaine immunogénicité

par sa partie constante mais surtout une faible pénétration tumorale. Il est donc urgent d'avoir accès à de nouvelles thérapies ciblées encore plus efficaces. Pour pallier ces limitations, l'association des compétences complémentaires de trois laboratoires partenaires a permis la conception, le développement et l'évaluation in vitro de nouveaux ADC à base de différents formats de mAb, afin d'offrir le meilleur format de ciblage possible pour les cytotoxiques anti-cancéreux. Après avoir validé in vitro leur affinité vis-à-vis de la cible et leur efficacité accrue par rapport au T-DM1, le projet proposé vise à évaluer leurs efficacités in vivo sur un modèle murin de cancer de sein HER2+.

Les objectifs de ce projet sont :

- 1) de mesurer la réduction tumorale et apprécier l'efficacité des traitements à base d'immunoconjugués anticancéreux (ICA) comparés au traitement de référence.
- 2) d'étudier la pharmacocinétique, la biodistribution et la pénétration tumorale des différents ICA synthétisés.

La règle des 3R sera scrupuleusement respectée. Remplacement : Après avoir validé in vitro la spécificité de nos fragments d'anticorps armés et démontrer leur intérêt thérapeutique, des études de validation préclinique de leur efficacité in vivo vis-à-vis de tumeurs HER2+ est absolument nécessaire. Il n'y a donc pas d'alternatives. Réduction: Le nombre d'animaux par groupe (10) a été réduit au maximum sans mettre en péril l'obtention de résultats nécessaires à la validation de l'hypothèse scientifique. Le nombre total d'animaux est de 1050 souris maximum sur une période de 5 ans, ce qui représente 210 animaux/an. Raffinement : le modèle animal utilisé a été choisi en prenant en compte l'état actuel des connaissances sur le sujet. Le milieu des animaux pendant la durée de l'expérimentation sera enrichi avec du papier absorbant et des cabanes de cellulose. Les injections réalisées se feront sur souris anesthésiées. Des points limites sont établis.

12068 INTRODUCTION :

Les paralysies laryngées bilatérales, souvent séquellaires de traitements chirurgicaux, altèrent profondément la qualité de vie des patients, dégradant leur respiration et/ou leur voix. Les traitements classiques imposent de faire un choix entre ses deux fonctions majeures. Seule la réinnervation laryngée sélective, permet de restituer une mobilité fonctionnelle du larynx. Mais la technique chirurgicale reste complexe. Sa simplification est l'objectif de nombreuses recherches actuelles, notamment dans le but d'être appliquée à un modèle de transplantation laryngée chez l'homme. Des thérapies cellulaires sont développées en ce sens.

Les Cellules Souches Ecto-Mésenchymateuse de la muqueuse olfactive (CSEM-MO) sont des cellules multipotentes qui se situent dans la lamina propria et l'épithélium de la muqueuse olfactive. Leur potentiel thérapeutique a été testé avec succès dans différents modèles animaux de paraplégie, de la maladie de Parkinson, de surdité et d'amnésie.

Les Cellules Gliales Olfactives (CGOs) sont des cellules macrogliales qui accompagnent les neurones olfactifs primaires depuis la muqueuse olfactive jusqu'au bulbe olfactif. Elles peuvent être cultivées à partir de biopsies de muqueuse olfactive, peu iatrogènes, chez l'homme, permettant d'envisager des stratégies de transplantations cellulaires autologues, dans le cadre de la régénération nerveuse périphérique. Ainsi, dans des modèles de paralysie laryngée unilatérale chez le rat (section/anastomose du nerf vague ou du nerf laryngé inférieur), ces cellules ont permis d'améliorer la réinnervation fonctionnelle du larynx. Il apparaît que cet effet thérapeutique est le fait de la présence de précurseurs de cellules gliales (PCGOs), maintenus à l'âge adulte chez les mammifères par la neurogenèse continue existant au sein du système olfactif primaire

La réparation nerveuse périphérique constitue un véritable défi pour le patient et le chirurgien. Devant les limites du traitement chirurgical, les équipes d'un consortium se sont unies pour proposer une approche de thérapie cellulaire capable de limiter l'inflammation et d'améliorer la croissance axonale. Au sein du consortium, notre équipe a pour objectif de conduire une étude pré-clinique basée sur la greffe autologue de cellules souches olfactives ou de cellules gliales olfactives dans un modèle rat de lésion du nerf laryngé inférieur afin d'étudier le potentiel thérapeutique de la greffe de ces cellules souches par des évaluations fonctionnelles, électrophysiologiques et histologiques.

Le but de cette étude est de montrer que l'interposition d'un tuteur veineux contenant des Cellules Souches Olfactives ou des Cellules Gliales Olfactives, entre le nerf vague et le larynx améliore la réinnervation laryngée après section du nerf laryngé inférieur, en guidant la repousse axonale. Cela ayant pour objectif de simplifier la technique de réinnervation laryngée tout en optimisant la récupération d'un larynx fonctionnel.

METHODE :

Ce projet ne peut être remplacé par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas d'animaux vivants. En effet, il n'est pas réalisable chez l'homme à l'heure actuelle (caractère expérimental). L'étude de greffe de cellules sur une lésion de nerf laryngé nécessite un système entier et ce projet ne peut pas être réalisé sur sujets non vivants du fait de l'évaluation d'une repousse axonale. Les sujets doivent être vivants pour l'évaluation fonctionnelle de l'efficacité des techniques appliquées au larynx (importance pour l'évaluation des capacités de respiration et de phonation engendrées par la mobilité laryngée).

Le modèle est le rat adulte syngénique Fischer. 102 rats Fischer seront utilisés : 72 rats femelles Fischer syngéniques de 10 semaines seront répartis en 4 groupes et 30 rats mâles Fischer de 3 semaines pour réaliser les cultures cellulaires. Un nombre minimum d'animaux seront donc inclus dans chaque groupe afin de permettre une étude statistique fiable de cette technique. En effet, le nombre d'animaux a été évalué à partir des études proches de celles-ci précédemment effectuées dans notre laboratoire et dont les statistiques avaient été établies pour réduire au minimum le nombre d'animaux opérés. De plus, le meilleur rendement des cultures cellulaires chez les jeunes rats permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires.

Les rats seront opérés sous anesthésie générale : induction par inhalation d'isoflurane à 5% puis entretien de l'anesthésie au masque par inhalation d'isoflurane à 2,5% et une injection de nalbuphine (5mg/kg) sera réalisée afin de réduire toute souffrance.

Les conditions d'hébergement seront conformes aux conditions recommandées. Les rats seront hébergés en groupe avec enrichissement du milieu (insertion de carré de cellulose).

Les conditions de soins, d'antalgie et les méthodes utilisées seront adaptées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux qui seront observés pluriquotidiennement durant toute la durée du protocole expérimental. Ainsi, le suivi du poids des animaux (10% de perte de poids de l'animal par exemple sera un des points limites), de la prise alimentaire, de l'aspect physique externe (état de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses) ainsi que l'apparition de sécrétions, d'excrétions anormales seront minutieusement surveillés et permettront de contrôler l'absence de souffrance, en complément de l'examen du comportement de l'animal (agitation, prostration...). De plus, du fait de la spécificité du protocole, une surveillance respiratoire sera instaurée parallèlement (augmentation de la fréquence respiratoire, stridor et dyspnée dans l'hypothèse d'une infection pulmonaire – fausses routes – d'une gêne laryngée excessive).

Tout signe de souffrance ou de points limites entraînera la mise à mort des animaux.

L'antalgie post-opératoire consistera en des injections de nalbuphine (5mg/kg) quatre fois par jour pendant 15 jours puis selon les signes de douleur observés. Un biberon contenant 200 ml d'eau sera supplémenté avec un paracétamol nourrisson associée à une surveillance accrue.

- 12069** La greffe pulmonaire constitue le traitement de l'insuffisance respiratoire terminale chez des sujets de moins de 65 ans bien sélectionnés. Le taux de survie à 5 ans s'est nettement améliorée depuis les années 90 mais restent inférieurs aux autres transplantations d'organes. La dysfonction primaire du greffon est une complication fréquente entre 30-50% et responsable d'une mortalité hospitalière importante. L'ischémie/reperfusion joue un rôle majeur dans les mécanismes de la dysfonction primaire. Dans le laboratoire le modèle précédent d'ischémie-reperfusion ne permettait une étude de la dysfonction que sur une heure. C'est pourquoi, des modèles de transplantation pulmonaire chez le petit animal ont été mis en place pour étudier les phénomènes physiopathologiques de l'ischémie-reperfusion et la dysfonction endothéliale

La stratégie de 3R nous a permis de limiter le nombre d'animaux nécessaire. En effet, la multiplicité des analyses sur le même animal au cours de l'étude nous permettra de diminuer le nombre d'animaux nécessaire (nombre total = 90) pour démontrer un effet significatif. Ces chiffres ont été établis au cours des études précédentes menées dans le laboratoire. De nos jours, il n'est pas possible de remplacer le modèle animal d'ischémie-reperfusion par un modèle in vitro. L'importance du microenvironnement, du flux sanguin et ventilatoire rendent la création de ces modèles très complexes et ils s'éloignent de la réalité clinique. Dans le cadre de la stratégie de raffinement, les interventions chirurgicales auront lieu 1 à 2 semaines après l'arrivée des animaux au sein de l'animalerie afin que les animaux aient un temps d'adaptation et de repos suite au voyage. La chirurgie et les prélèvements auront lieu dans une pièce isolée, calme, avec un seul expérimentateur présent afin de limiter les mouvements et les sources de bruit.

Ce projet a pour objectif principal d'étudier la dysfonction endothéliale développée au cours de travaux précédents dans un modèle de transplantation pulmonaire permettant d'avoir des durées d'ischémie et de reperfusion plus longues que dans le modèle précédent de clampage du hile pulmonaire gauche. Les travaux antérieurs ont permis la mise au point des différents marqueurs fonctionnels et morphologiques de la dysfonction de l'endothélium vasculaire pulmonaire qui seront utilisés dans notre étude.

Le projet va comprendre 4 groupes de 15 rats Wistar de 350 à 400g. Deux groupes vont être des contrôles chacun comportant 15 rats, ils vont bénéficier d'une anesthésie générale et d'une thoracotomie gauche. Les deux autres groupes contenant chacun 15 rats vont avoir une transplantation pulmonaire orthotopique gauche avec des temps de reperfusion différents un groupe avec 6 heures de reperfusion et un autre avec 24 heures. Pour les groupes "greffe", nous allons utiliser 30 rats donneurs de poumon.

Les 4 groupes bénéficieront d'une anesthésie générale par une induction d'isoflurane 5% puis d'un entretien à 2% associée à une injection de Xylazine 0,40 mg/kg en intra péritonéal. Les rats seront installés sur une plaque chauffante avec une surveillance de la température corporelle. Avant l'incision tous rats bénéficieront d'une analgésie complémentaire par buprenorphine 0,08 à 0,05 mg/Kg par voie sous-cutanée, répétée toutes les 12 heures. De plus, nous appliquerons sur la peau de la Lidocaine gel 1%. La profondeur de la sédation sera vérifiée avant de commencer la procédure (absence réflexe moteur par pression modérée des doigts). Les animaux seront ventilés artificiellement à l'aide d'un respirateur pour rongeur. En raison du réveil dans les 4 groupes, un contrôle biquotidien des signes de souffrance sera réalisé par un personnel formé associé à une analgésie par buprenorphine 0,01 à 0,05 mg/Kg toutes les 8 à 12 heures en sous cutané.

En cas de souffrance de l'animal (respiration pénible, bruyante et faible, poils hérissés, dos arrondis, animal recroquevillé, prostration avec réduction importante de l'activité motrice, ...) avant les 24 heures de perfusion, les animaux sont mis à mort par une injection létale de thiopental (60mg/Kg).

Le protocole comprend deux temps expérimentaux. Un temps T0 juste après le conditionnement des rats (anesthésie-intubation), on réalisera un prélèvement sanguin de 1mL pour étudier l'inflammation systémique (IL-1 β , l'IL-10 et le TNF- α) et la dégradation du glycocalyx (dosage du syndécane-1 et de l'héparane sulfate).

Le deuxième temps se situera au moment de la mise à mort après 6 ou 24 heures de reperfusion, sur prélèvement sanguin et sur prélèvement tissulaire nous étudierons l'inflammation systémique et tissulaire (IL-1 β , l'IL-10 et le TNF- α) et la dégradation du glycocalyx (dosage du syndécane-1 et de l'héparane sulfate).

L'artère pulmonaire sera disséquée et sa vasoréactivité sera évaluée par myographe de Mulvany.

Le poumon droit sera disséqué et libéré de la cage thoracique puis pesé immédiatement après la mise à mort puis à J5 pour l'étude de la gravimétrie.

Deux rats par groupe seront perfusés avant la mise à mort par Nitrate de Lanthane puis l'artère pulmonaire sera disséquée et le glycocalyx sera ensuite visualisée en microscopie électronique.

12070 Les microparticules (MPs) constituent une population hétérogène de petites vésicules extracellulaires résultant du bourgeonnement de la membrane cellulaire en réponse à une activation ou une apoptose. Longtemps considérées comme de simples débris cellulaires dépourvus de fonction, elles sont désormais reconnues comme de véritables entités subcellulaires dotées d'activités biologiques, parmi lesquelles leur activité procoagulante qui contribue à la formation du thrombus. Cependant, des travaux réalisés au sein de notre équipe ont permis de montrer que certaines sous-populations de MPs sont impliquées dans la lyse du thrombus. Cette nouvelle activité s'appelle l'activité fibrinolytique (CGP). Ainsi les MPs portent à la fois des molécules procoagulantes et fibrinolytiques supportant des activités à finalité opposées sur l'hémostase. La résultante dépend d'une balance entre ces activités procoagulantes et profibrinolytiques que nous appelons "balance coagulolytique des MPs". Cette balance varie en fonction de l'origine cellulaire des MPs et du stimulus qui a provoqué leur formation.

Le choc septique est un syndrome clinique grave qui s'accompagne notamment d'un déséquilibre de l'hémostase. Des données préliminaires ont permis de montrer que la CGP dépendante des MPs est élevée chez les patients en choc septique et qu'elle est significativement augmentée chez les patients survivants comparés aux patients décédés. Nous avons également montré in vitro la capacité des MPs de patients en choc septique, à lyser de manière active un thrombus. L'objectif de ce projet est donc d'étudier l'impact de l'activité de lyse des MPs in vivo dans un modèle de choc septique.

Dans un premier temps nous proposons d'étudier la relevance in vivo de l'activité fibrinolytique des MPs à partir d'un modèle murin de choc septique. A partir du monitoring et de la surveillance étroite des animaux, nous souhaitons évaluer l'impact de l'injection de MPs fibrinolytiques sur l'évolution et la survie dans le choc septique.

Dans un deuxième temps nous souhaitons développer un modèle de fibrinolyse de thrombose murine qui nous permettra de mesurer l'impact de l'activité fibrinolytique des MPs sur la formation et le devenir de microthrombi in vivo.

A terme ce projet vise à explorer le potentiel protecteur de certaines MPs circulantes dans le choc septique afin de proposer une prise en charge thérapeutique personnalisée et ciblée à chaque patient en fonction de l'activité coagulolytique des MPs circulantes.

L'ensemble des procédures envisagées nécessitera au maximum un total de 294 souris sur 3 ans. Ce nombre nécessaire d'animaux a été calculé pour permettre une étude statistique fiable (3R : Réduction). Au cours de nos expériences la souffrance sera évaluée grâce à une grille d'évaluation de la douleur et sera prévenue par l'utilisation répétée d'antalgiques. Les animaux seront hébergés dans des cages avec enrichissements à types de copeaux, nids et tunnels, avec alimentation et eau ad libitum (3R : Raffinement). Le recours à l'expérimentation animale se justifie par l'impossibilité réglementaire de conduire ce type de recherche chez l'homme sain, et le choix de l'espèce par le besoin d'un modèle animal déjà documenté en l'absence d'alternative possible (3R : Remplacement). La surveillance de l'absence d'atteinte de point limite (voir 3.4.13) sera réalisée également. Si nous observons un comportement de souffrance suite aux interventions (et sur la base d'une grille d'évaluation de la souffrance), un antalgique (tramadol 20mg/kg) sera administré.

Pendant la chirurgie, l'animal est anesthésié (en fonction de la procédure : Kétamine 100mg/kg, midazolam 10mg/kg ou Kétamine 125 mg/kg, xylazine 12.5 mg/kg, atropine 0.25 mg/kg) et la respiration est suivie. L'animal est réchauffé par une table ou couverture chauffante ce qui permet de maintenir sa température interne et de lutter contre l'hypothermie due à l'anesthésie.

Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (augmentation de la fréquence respiratoire visible au niveau des flancs), si l'animal est prostré ou en retrait, ou s'il présente une perte de poids supérieure ou égale à 20% du poids de départ.

12071 Nous souhaitons analyser et comprendre comment les malformations à l'origine des maladies neurodéveloppementales sont générées, et comment les réseaux neuronaux sont altérés de manière permanente. Notre hypothèse est que ces altérations commencent in utero et/ou à la naissance. Les maladies regroupant ce que l'on appelle les troubles du spectre autistique (TSA)

sont caractérisées notamment par un défaut d'interactions sociales et de communication ainsi que par des comportements restreints et répétitifs. Les TSA affectent 1 enfant sur 100 (643 000 personnes en France, dont 160 000 enfants) et constituent un problème majeur en termes de santé publique. De nombreuses études effectuées chez l'homme font état, dans le cerveau des individus autistes, d'un changement des réseaux neuronaux. Au cours du développement embryonnaire, les neurones ne sont pas tous générés au même moment, mais par vagues successives. Ils naissent dans une région particulière du cerveau avant de migrer vers leur destination finale selon un programme prédéfini qui permet la construction progressive du cerveau. Notre postulat est, que dans les TSA, ce programme est perturbé. Ainsi, la ou les causes de la maladie affecteraient différemment les neurones en fonction de leur identité et du moment où ils ont été générés, dérégulant le programme de formation du cerveau. Notre projet a pour but d'identifier et de suivre le développement de différents types neurones générés à différents stades embryonnaires chez la souris saine versus autiste. Pour se faire, nous utiliserons deux modèles murins d'autisme : génétique et environnemental qui reflètent les différents types de TSA que l'on retrouve chez l'Homme. Le modèle génétique se caractérise par une modification d'un gène de la souris et le second par une injection d'une drogue chez la souris gestante, induisant la maladie chez les souriceaux. Les deux modèles développent à l'âge adulte des caractéristiques typiques des TSA. Caractériser l'état de développement des neurones au moment de la naissance en condition normale et autistique permettrait d'ouvrir la voie vers le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques spécifiques.

Le projet comprend 3 objectifs impliquant 163 souris.

Objectif 1 : Etude de l'impact de l'exposition au valproate in utero sur une génération ciblée de neurones. Nous générerons des animaux autistes en traitant des femelles gestantes par valproate (VPA) pendant leur gestation. Nous travaillerons sur un modèle de souris issu du croisement de deux lignées génétiquement modifiées et chez lesquelles nous administrerons une substance permettant l'identification d'un type particulier de neurones nés uniquement le jour de l'administration. Nous induirons les TSA chez ces souris grâce au VPA et nous comparerons les neurones issus de souris saines et autistes.

Objectif 2 : Etude de l'organisation des neurones et d'un autre type de cellules du cerveau (les cellules microgliales) chez des animaux atteints d'une forme génétique de TSA : le syndrome de l'X-Fragile. Nous évaluerons la structure anatomique des neurones et l'état inflammatoire dans le cerveau de souris atteintes de cette forme génétique de TSA.

Objectif 3 : Etude du développement des interneurones du système nerveux central à la naissance. Les interneurones sont un type de neurones qui permettent la communication à l'intérieur d'une structure du cerveau. Nous travaillerons sur un modèle de souris issu du croisement de deux lignées modifiées génétiquement, afin d'obtenir une souris dans laquelle un type particulier d'interneurones exprime une molécule fluorescente, ce qui permet de les identifier.

Sur les animaux, nous effectuerons les manipulations suivantes :

- Traitement par VPA : le produit sera dissout dans une solution saline et injecté dans la cavité péritonéale des souris gestantes afin d'induire l'autisme chez les souriceaux. Le volume injecté sera calculé pour ne pas causer de douleur par distension de la paroi abdominale.

- Administration d'une substance permettant l'identification d'un type particulier de neurones: le produit sera dissout dans de l'huile végétale et introduit dans l'estomac des femelles gestantes via une canule à bout rond (afin d'éviter toute blessure). L'utilisation de l'huile permettra l'introduction aisée de la canule. Le volume introduit sera calculé pour ne pas causer de douleur par distension de l'estomac.

Après ces manipulations, les souris seront surveillées pour détecter le moindre signe de détresse et placées en cages individuelles équipées, en plus de l'enrichissement de base, de matériaux de nidification, ce qui permettra aux animaux de récupérer et de se préparer à la mise-bas.

Cette étude se focalise sur l'organisation des réseaux neuronaux autour de la naissance, et ne peut donc être reproduite ou étudiée dans des modèles de cultures cellulaires in vitro. De plus, les souris transgéniques permettent de réaliser des expériences sur des modèles de maladies comme les

troubles du spectre autistique. Cependant, pour limiter le nombre d'animaux, ce projet préliminaire a été planifié afin d'appliquer au mieux les principes de réduction et de raffinement. En effet, nous avons déterminé de manière statistique le nombre d'animaux que nous allons utiliser par objectifs et par tâches. Dans cette même optique, ce projet préliminaire nous permettra de faire plusieurs mesures par souris, réduisant le nombre d'animaux. Nous avons également prévu dès que possible d'utiliser tous les animaux générés par les croisements. Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement via la mesure de leurs poids et l'observation de leur aspect et comportement, particulièrement après injection du VPA. Une grille de score sera utilisée afin de définir les points limites et, en fonction, des mesures seront prises pour réduire le stress et la douleur de l'animal.

12072 Alors que les nanomédicaments font déjà leur preuve en cancérologie depuis plusieurs décennies et ce grâce au ciblage spécifique des cellules cancéreuses permettant de réduire les toxicités tout en augmentant leur efficacité, les immunothérapies sont la grande nouveauté de ce domaine de recherche. Bien que bénéficiant de résultats spectaculaires dans quelques types de cancer (poumon, rein, ORL...), encore très peu de patients (20%) répondent à ces immunothérapies. La présence d'un environnement immunitaire défavorable est l'hypothèse principale expliquant cet important échappement thérapeutique. Plus récemment, il a été démontré, que cet environnement immunitaire peut être modifié et même optimisé avec des nanomédicaments. En effet, cet environnement est étroitement lié au comportement des nanoparticules dans l'organisme.

Dans ce contexte, il paraît capital d'étudier la capacité des nanoparticules à moduler le système immunitaire, pour étudier par la suite l'intérêt de futures associations nanomédicaments/immunothérapie et ce pour le traitement du cancer du sein.

Les cancers du sein font typiquement partie de ces tumeurs solides n'ayant que peu ou pas répondu à l'immunothérapie. Ainsi les nanomédicaments semblent être des candidats de choix pour les associer à l'immunothérapie. En effet, l'utilisation de nanomédicaments, permet de déclencher une réponse du système immunitaire, permettant ainsi d'optimiser l'environnement immunitaire et donc l'efficacité des immunothérapies. De plus il a déjà été démontré que certains agents anticancéreux (dont le docétaxel) peuvent également optimiser cet environnement immunitaire.

Toutes ces actions plaident pour la mise en place de stratégies d'association entre nanomédicament et immunothérapie, et plus particulièrement avec un nanomédicament de docétaxel. La perspective immédiate de notre projet est donc d'étudier, chez l'animal, les propriétés de modulation de l'immunité d'un nanomédicament de docétaxel.

Du fait des interrelations étroites entre les acteurs de la réponse immune, l'immunogénicité de la nanoparticule, les propriétés immunomodulatrices du docétaxel, elles-mêmes sous la dépendance des caractéristiques pharmacocinétiques des vecteurs et leur capacité à cibler la tumeur et le microenvironnement tumoral, l'ensemble des données récoltées devra faire l'objet d'études poussées en modélisation, de façon à déterminer informatiquement au mieux les conditions d'association des nanomédicaments avec l'immunothérapie (ici, Atezolizumab). Ce modèle mathématique permettra de déterminer un schéma d'administration optimal permettant de tirer le maximum d'efficacité. Une fois ce schéma défini par pharmacométrie, nous le validerons sur l'animal. Pour se faire, nous travaillerons sur 180 souris (nombre minimum nécessaire afin de générer des résultats pertinents). Tout le long de l'étude, le bien être des souris sera respecté (les 5 libertés fondamentales: absence de faim, soif, douleur, stress, peur et possibilité d'exprimer des comportements spécifiques) et les souris seront surveillées quotidiennement. Les souris seront hébergées au maximum au nombre de 6 dans des cages enrichies et les points limites de l'étude seront initialement établis afin de réduire l'inconfort des animaux au cours de cette étude. Afin de limiter au maximum la douleur de l'animal, les souris seront anesthésiées et sur tapis chauffant lors des expérimentations animales (c'est-à-dire : greffe tumeur, injection des traitements et prélèvements sanguins et tissulaires). Du paracétamol sera également mis de manière préventive dans l'eau de boisson.

Le projet débutera par un travail d'évaluation des modifications immunitaires dépendamment du traitement reçu en comparant si oui ou non le nanomédicament modifie l'expression des effecteurs immunitaires. Les data générés seront analysés pharmacométriquement dans un modèle

mathématique qui permettra de définir ainsi les modalités optimales d'association du nanomédicament avec l'immunothérapie afin d'être le plus efficace possible. Ainsi la troisième étape visera à étudier et valider cette meilleure efficacité antitumorale qui sera apportée par l'association nanomédicament/immunothérapie.

12073 Les accidents ischémiques cérébraux (AIC) restent une cause majeure de handicap neurologique, de troubles cognitifs et de mortalité. Le traitement de la phase aiguë des AIC comporte à ce jour la réalisation d'une thrombolyse dans les 4h30 suivant l'apparition des symptômes associés à une thrombectomie dans les 6 heures. Les principales limites de ces traitements sont : 1) une mauvaise tolérance avec notamment un risque de transformation hémorragique (TH). 2) une efficacité imparfaite.

Sur le plan physiopathologique, de nombreuses études expérimentales ont montré un rôle majeur de phénomènes microvasculaires dans le développement des lésions neurologiques. Ceux-ci font intervenir à la fois une thrombose microvasculaire et des mécanismes inflammatoires avec notamment un recrutement de neutrophiles participant aux TH. Pourtant, l'importance et la réalité de ces phénomènes, leur chronologie et les principaux acteurs cellulaires et moléculaires restent encore débattu dans la littérature.

Ce projet consistera en la réalisation sur 5 ans de plusieurs études expérimentales dans un modèle d'AIC chez la souris (426 souris) et le rat (200 rats). Les objectifs principaux seront de cibler les neutrophiles (élastase neutrophilaire et NETS) et les plaquettes (récepteur GPVI et P-sélectine) afin de réduire les phénomènes microvasculaires et ainsi améliorer le pronostic neurologique après un AIC.

Ce projet est construit en intégrant au maximum la préconisation des 3 R :. Le recours à des expériences chez des murins viendra en support de nos résultats obtenus dans des systèmes in vitro et dont l'efficacité biologique nécessite d'être vérifiée in vivo. L'objectif de notre étude est l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques efficace pour l'ischémie cérébrale aiguë avec une translation rapide à la recherche clinique. L'effet biologique des molécules utilisées sur leur cible a été démontré in vitro. La démonstration de leur effet bénéfique thérapeutique avant transposition chez l'homme ne peut se faire que dans un modèle animal proche de la physiopathologie humaine. Les modèles murins d'AIC permettent de reproduire la physiopathologie de l'AIC chez l'homme. Raffiner les modèles d'études actuels afin de Réduire le nombre d'animaux inclus dans les protocoles expérimentaux. Les procédures expérimentales ont été pensé pour utiliser le moins d'animaux possible. Un calcul statistique du nombre de sujet nécessaire est réalisé à priori. Ils permettent d'évaluer le nombre d'animaux à inclure pour obtenir des résultats significatifs tout en minimisant ce nombre. Ces calculs sont possibles grâce à l'étude des résultats antérieurs avec ces modèles animaux Afin de réduire au maximum la douleur des animaux, des points limites ont été définis associés à l'évaluation répétée des animaux par un score clinique et des échelles de douleur. Une analgésie avec de la buprénorphine sera réalisée systématiquement en post-opératoire afin de limiter la douleur pour chaque procédure. L'efficacité de cette analgésie sera réévaluée 6h après la chirurgie et complété par une deuxième injection de buprénorphine à demi-dose si besoin. Les animaux seront maintenus sans isolement, les cages seront équipées d'enrichissement afin d'éviter tout stress supplémentaire et l'entretien des animaux sera fait par des personnes compétentes et expérimentées.

A terme ce projet donnera des résultats préliminaires de l'efficacité thérapeutique de 4 molécules pour le traitement des AIC afin de les transposer in fine chez l'homme.

12074 L'épilepsie du lobe temporal, souvent déclenchée par un évènement ponctuel (crise initiale déclenchée par une forte fièvre, une infection, un accident...), se caractérise par la survenue de crises intermittentes et souvent imprévisibles, parfois des mois ou même des années après la crise initiale. Les épilepsies du lobe temporal sont souvent résistantes à tous les traitements anti-épileptiques. Afin d'agir si possible avant le stade pathologique irréversible, il est par conséquent d'un grand intérêt thérapeutique de comprendre comment le circuit passe d'une crise isolée à un état chronique d'épilepsie résistante, après une période de latence sans crise. Le but de ce projet

est d'étudier les modifications neuronales du circuit hippocampique (principal siège de l'épilepsie du lobe temporal chez l'humain) afin de mieux comprendre la genèse de l'épilepsie, dans sa phase aigüe initiale et dans sa transition vers la phase chronique.

L'étude de modèles animaux est essentielle pour identifier les mécanismes en cause. Cette étude sera donc réalisée sur des modèles expérimentaux chez le rongeur (souris), qui reproduisent cette dualité entre crise aigüe (déclenchée par l'injection ponctuelle d'agents convulsivants) et épilepsie (chronique). Nous profiterons également des possibilités offertes chez la souris par les techniques de biologie moléculaire (optogénétique) permettant de manipuler l'activité de populations neuronales spécifiques afin de mieux comprendre comment elles contrôlent le circuit hippocampique et la genèse de l'épilepsie.

Du fait de l'organisation de notre institut avec deux zones distinctes d'expérimentation animale (dénommées R1 et R2) au sein du même bâtiment mais ayant chacune leur numéro d'agrément, les procédures sont réparties et décrites dans deux saisines distinctes (l'une pour R1, l'autre pour R2). Certains animaux doivent passer d'une zone à l'autre au fil des procédures. Le transfert se fait dans des cages d'élevage standards munies d'un couvercle filtrant, et prend à peine quelques minutes.

Les avantages escomptés du projet sont une meilleure compréhension du fonctionnement cérébral et de ses pathologies (notamment l'épilepsie), ce qui représente un intérêt sociétal considérable.

Ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement.

Remplacer: Le projet porte sur l'étude de la dynamique des interactions neuronales impliquées dans la transition entre crise ponctuelle et épilepsie chronique. Ceci ne peut se faire que sur l'animal vivant car il n'existe pas de modèle réaliste de cette transition progressive vers l'épilepsie *in vitro* ou *in silico*. Nous avons opté pour l'utilisation de la souris car ces rongeurs présentent le meilleur équilibre entre les bénéfices (accessibilité expérimentale et pertinence par rapport aux pathologies chez l'humain) et les dommages escomptés (souffrance liées aux conditions d'élevage ou d'expérimentation).

Réduire: Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux permettant d'assurer la fiabilité statistique de notre étude. Nous utiliserons ainsi 120 souris sur 8 mois.

Raffiner: A part dans la période de récupération post-chirurgicale, les animaux seront autant que possible hébergés en cages collectives, afin de limiter le stress dû à l'isolement. Les cages seront également enrichies en nids de coton. Les actes chirurgicaux seront effectués dans les règles de l'art du point de vue de l'asepsie, de l'anesthésie, et sous traitement antalgique. Une surveillance particulière sera portée aux animaux en période péri-opératoire. Des analgésiques seront administrés en cas de douleur. Des points limites sont définis pour mettre fin à l'expérimentation en cas de douleur ou de souffrance excessive, notamment associée à l'état épileptique.

12075 Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) sont des cancers agressifs du sang qui surviennent principalement chez les enfants et plus rarement chez les adultes. Ces cancers sont traités par des combinaisons thérapeutiques souvent responsables de toxicités importantes et qui ne conduisent malheureusement pas à une guérison totale. Malgré l'amélioration constante des traitements proposés, 30 à 40% des patients sont résistants aux thérapies actuelles ou rechutent après un premier traitement avec une espérance de vie médiocre. Cela souligne donc l'importance de découvrir de nouvelles thérapies plus ciblées et plus efficaces grâce à une meilleure compréhension des mécanismes responsables de la résistance et/ou de la rechute aux traitements actuels.

Dans ce projet, nous utiliserons des souris immunodéficientes (dépourvues de système immunitaire et supportant ainsi la greffe de cellules tumorales humaines). Après une étape d'irradiation sublétales (ne conduisant pas à la mort de l'animal), nous injecterons par voie intraveineuse (procédure sur souris vigiles) des cellules tumorales de patients atteints de LAL. Nous testerons alors *in vivo* le bénéfice de nouveaux traitements, qui seront administrés à des souris vigiles par voie intraveineuse, intrapéritonéale ou par gavage selon les posologies utilisées classiquement en clinique. Le traitement sera initié dès que le pourcentage de cellules leucémiques dans la moelle osseuse sera supérieur à 0,5%. L'évolution de la maladie chez les souris ainsi que l'efficacité thérapeutique des

drogues testées reposera sur la mesure de la prise de greffe des cellules leucémiques dans le temps par des prélèvements de sang (sur souris vigiles) et de moelle osseuse (sur souris anesthésiées) ainsi que par des techniques d'imagerie in vivo non invasives réalisées sous anesthésie gazeuse. Les expériences d'imagerie seront réalisées de façon hebdomadaire à partir de deux semaines après l'injection des cellules leucémiques. Le suivi des souris en expérimentation se fera sur une période maximale de 12 mois après l'injection des cellules tumorales, à l'issue de laquelle tous les animaux seront euthanasiés. A terme, ce projet devrait permettre de mieux comprendre les LAL et les mécanismes responsables des phénomènes de résistance et/ou de rechute et ainsi contribuer à l'amélioration des thérapeutiques proposées aux patients.

En accord avec la règle des 3R, nous réaliserons le maximum d'expériences in vitro. Néanmoins, l'utilisation d'animaux est indispensable car malheureusement les cellules de patients sont beaucoup trop fragiles et trop rares à l'issue de l'analyse médicale diagnostique pour réaliser des analyses cellulaires in vitro extensives et une étape d'amplification dans un modèle animal est donc incontournable. Au total, nous utiliserons dans ce projet 1660 souris sur une durée de 5 ans. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum après estimation des effectifs basée sur les données antérieures du laboratoire et une simulation statistique afin de garantir l'obtention de résultats statistiquement recevables. Une attention toute particulière sera également portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément de celle des expérimentateurs. Nous veillerons aussi à réduire au minimum (intensité et durée) les souffrances ressenties par les animaux, en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence physique, le poids et le comportement des animaux ainsi que le développement de la maladie. Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt qui lorsqu'ils sont atteints conduiront à l'euthanasie de la souris.

12076 Les pathologies cardiovasculaires-en particulier l'infarctus du myocarde (IM) - représentent la principale cause de mortalité à ce jour. L'IM est la conséquence de l'obstruction des artères coronaires. Celle-ci conduit à une ischémie tissulaire qui induit une mort des cellules contractiles du coeur, les cardiomyocytes, puis à une insuffisance cardiaque.

La réponse inflammatoire associée à l'IM joue un rôle majeur dans le contrôle de la fonction cardiaque et implique de nombreuses cellules communiquant entre elles. Récemment les vésicules extracellulaires (VEs) ont été décrites comme un nouveau mode de communication.

Notre projet a pour but d'étudier, chez la souris, le rôle de ces vésicules extracellulaires (VEs) d'origine cardiaque susceptibles d'agir comme des messagers intercellulaires lors de l'infarctus du myocarde. Pour cela, nous évaluerons 1- quelles cellules captent les VEs localement et à distance et 2- quel est l'effet d'un tel transfert.

La souris est le meilleur modèle animal permettant d'étudier le processus inflammatoire associé à l'infarctus du myocarde. L'analyse consistera à étudier la réponse inflammatoire en fonction du temps ainsi que l'étude de la fonction cardiaque et du remodelage associé par échocardiographie. Cette étude est prévue sur 5 ans et nécessitera au total 2880 souris.

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et définies afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. En effet, nos données in vitro nous ont déjà permis d'identifier certaines des cellules réceptrices. De plus des paramètres expérimentaux tels que le nombre d'animaux ou bien encore les durées de traitements ont déjà été déterminés par d'autres projets nous permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des animaux, toutes les procédures se feront sous anesthésie générale et des traitements antalgiques sont prévus. Nous avons établi une grille d'évaluation des points limites, si ces paramètres sont atteints, une mise à mort anticipée des animaux sera réalisée.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes impliquant les vésicules extracellulaires dans le contrôle de l'inflammation associée à l'infarctus du myocarde. Ces résultats pourraient permettre d'envisager dans le futur le développement de nouvelles thérapies.

12077 La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI) qui touche entre 100000 et 150000 patients en France et près de 1 million en Europe. La physiopathologie de la MC reste mal connue, mettant en jeu une dysrégulation du système immunitaire intestinal en réponse à des antigènes d'origine bactérienne chez des personnes génétiquement prédisposées. Soixante-dix pourcents des malades subiront une intervention chirurgicale au moins une fois dans leur vie et près de la moitié des malades opérés nécessiteront d'autres interventions chirurgicales pour récives des lésions digestives de MC.

Il n'existe pas de traitement curatif de la MC. Les molécules actuellement disponibles ont pour objectif de traiter les poussées inflammatoires et/ou de prévenir leurs apparitions. Le traitement chirurgical, avec résection des segments digestifs pathologiques, survient le plus souvent après échec du traitement médicamenteux et ne protège pas de la récive de la MC. Les mécanismes sous-jacents à la récive post-chirurgicale sont mal compris même si différentes hypothèses, comme l'obstruction des canaux lymphatiques, ont été avancées. Par ailleurs, il n'existe pas de modèle animal fiable et reproductible qui permettrait l'étude d'une telle récive. Or, un tel modèle animal permettrait :

- 1- De progresser dans la compréhension de la physiopathologie de la récive post-chirurgicale
- 2- D'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques dans la MC.

Une cinquantaine de modèles de colite sont décrits chez les rongeurs, mais un seul d'entre eux concerne la récive post-chirurgicale. Ce modèle de récive post-chirurgicale a été décrit en 2011 chez la souris IL-10 KO, après résection iléo-caecale et anastomose iléo-colique. L'exposition à des germes digestifs provoque une inflammation sur l'intestin grêle en amont de l'anastomose en plus de l'inflammation colique. Les animaux nourris par une alimentation dépourvue de tout germe ne développent pas d'inflammation digestive que ce soit au niveau iléal ou au niveau colique. Ce modèle, est de réalisation difficile et n'a jamais été reproduit. Il nécessite la réalisation d'une anastomose par microchirurgie ainsi qu'une alimentation et une stabulation en environnement stérile. De plus, le taux de colites induites chez les souris IL-10 KO est très aléatoire selon les élevages.

Le modèle de colite induite chez le rat transgénique HLA B27 semble intéressant à plusieurs titres :

- colites spontanées autour de leur 12ème semaine de vie
- stabulation en milieu non stérile
- animal plus gros que la souris ne nécessitant pas de microchirurgie

L'évaluation de la récive inflammatoire intestinale post-chirurgicale a commencé à être étudiée avec un projet. Ainsi, les objectifs principaux de ce travail de recherche seront de continuer la mise au point du modèle de récive post-chirurgicale de MC chez le rat transgénique HLA B27, d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires et thérapeutiques de composés de synthèse (médicaments « candidats ») mais également de micro-organismes ou de stratégies nutritionnelles ou encore de levures. Ces évaluations précliniques n'interviennent toutefois qu'après une caractérisation et une sélection préalable rigoureuse des effets analgésiques et/ou anti-inflammatoires, modificateurs de la flore, chélateurs de métaux, permettant de moduler la motricité musculaire de l'intestin. Ces composés seront ensuite testés afin de limiter au mieux le nombre d'animaux (Réduire). Il n'est cependant pas possible de modéliser in vitro un processus aussi complexe que le tube digestif et le microbiote ; de plus, les stratégies nutritionnelles nécessitent l'ingestion des composés à tester afin qu'ils agissent au « bon endroit » sur leur cible (Remplacer). Les procédures sont en outre définies au mieux pour offrir le maximum de confiance dans les résultats générés dans le respect du bien-être des animaux en limitant la souffrance animale (Raffiner).

Le nombre total d'animaux sur les 5 ans à venir est estimé au maximum à 1320 rats en 2 procédures distinctes.

12078 En 2020, l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (HFpEF) deviendra la forme majoritaire de l'insuffisance cardiaque avec un taux de mortalité similaire à celui de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite (HFrEF). Cependant, contrairement à l'HFrEF, il existe un

manque de consensus concernant la physiopathologie et la définition de l'HFpEF. Il est donc urgent de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie dans le but de développer de nouveaux médicaments. Une théorie sur laquelle tout le monde s'accorde mais qui n'a pas été vérifiée suggère que les facteurs de risque cardiovasculaire (obésité, diabète de type 2, hypertension etc...) entraînent une inflammation systémique qui à son tour entraîne une dysfonction endothéliale puis secondairement l'HFpEF. Cependant, le rôle de la dysfonction des microvaisseaux dans la physiopathologie de l'HFpEF n'a jamais été démontré.

Ce projet se propose d'explorer l'étiologie et les conséquences fonctionnelles de la dysfonction des microvaisseaux cardiaques dans la physiopathologie de l'HFpEF à l'aide de 3 modèles murins. Le premier modèle "physiologique" réunit au moins 3 facteurs de risque pour l'HFpEF, c'est à dire l'âge, le diabète et l'obésité. Le deuxième modèle murin présente une dysfonction endothéliale génétiquement induite, ce modèle est nécessaire pour tester si la dysfonction endothéliale est suffisante pour induire l'HFpEF et la troisième modèle une altération de la fonction des cellules murales vasculaires.

Ce programme de recherche sur 5 ans impliquera 960 souris. REDUCTION: Pour réduire le nombre d'animaux, aucune expérience déjà publiée ne sera reproduite. Par ailleurs, suite à notre expérience concernant l'étude de l'histologie et de la fonction cardiaque, 10 animaux par lot sont nécessaires pour obtenir des résultats exploitables statistiquement. REMPLACEMENT: Lorsque cela sera possible, les études conceptuelles seront réalisées in vitro sur des cellules en culture avant d'être testées in vivo. Cependant l'insuffisance cardiaque est une pathologie complexe mettant en jeu des interactions entre de nombreux types cellulaires locaux et circulants qui ne peuvent pas être reproduites in vitro. RAFFINEMENT: les animaux sont hébergés dans en cage collective sur portoir ventilé, sur de la litière en cellulose enrichie ALPHA-dry + PLUS. L'eau et la nourriture sont fournies à volonté. Pour le bien-être des souris un igloo est ajouté dans chaque cage. Les animaux sont surveillés par la visite quotidienne du zootechnicien. La souffrance des animaux est réduite par l'usage d'anesthésiques et d'antalgiques adaptés pour la réalisation des gestes douloureux. En cas de problème de santé des animaux, l'expérimentateur est immédiatement alerté. Il prendra la décision de la mise à mort en fonction de la grille « ; Observation-Action ».

12079 Depuis plusieurs décennies, la lutte contre les strongles gastro-intestinaux (Vers parasite appartenant à la famille des Nématodes et se retrouvant dans l'intestin des mammifères, ici des ovins) a reposé exclusivement sur l'emploi de molécules chimiques à activité antihelminthiques, appartenant à 3 familles dites à large spectre. Toutefois, ces molécules de synthèse ont longtemps été appliquées de façon non raisonnée, sans analyse des risques spécifiques à chaque élevage. Ces pratiques ont conduit au développement croissant de résistances à ces molécules. Plusieurs études in vitro et in vivo ont montré que la consommation par les petits ruminants d'aliments riches en métabolites secondaires bioactives (MSB) perturbe la biologie des strongles gastro-intestinaux et la dynamique des infestations. Cela favorise la résilience des animaux infestés et le maintien des performances de production. Ces études ont conduit au développement du concept d'Alicaments, c'est-à-dire une ressource combinant une bonne valeur nutritionnelle et des effets bénéfiques sur la santé animale. Au niveau de l'élevage ovin et caprin en France, il n'existe à ce jour pas de références précises et opérationnelles, pourtant très attendues dans le contexte actuel, sur le pâturage des prairies riches en MSB, que ce soit sur les aspects zootechniques, antiparasitaires ou encore environnementaux. Ce projet de recherche paraît donc nécessaire pour le conseil en élevage dans un contexte où l'éleveur est en constante recherche de solutions pour améliorer ses performances d'élevage et son revenu, tout en produisant dans le respect des attentes sociales et environnementales. Ce projet étudie l'intérêt d'un pâturage de prairies à base de plantes riches en métabolites secondaires bioactifs, pour limiter et contrôler les niveaux d'infestations parasitaires par les strongles gastro-intestinaux chez les agneaux en croissance. Au final, le projet a pour objectif principal de proposer des solutions alternatives aux traitements antiparasitaires, basées sur le pâturage de plantes bioactives, le plantain ou encore la chicorée utilisée pure ou en mélange.

Dans notre contexte pédoclimatique, la chicorée et le plantain lancéolé semblent les espèces fourragères les mieux adaptées. Pour tester leur intérêt, un dispositif expérimental a été imaginé

composé de 4 traitements (1 témoin : pâturage de prairie permanente ; 1 lot : chicorée pure ; 1 lot : plantain pure et un lot mélange : 50% chicorée et plantain). Chaque traitement expérimental est composé de 24 agneaux (50% mâles et femelles). Du sevrage à l'abattage, les 3 lots "essais" pâtureront leur parcelle « alicament » sur une séquence de 2 semaines minimum (temps minimum pour mesurer un effet des plantes). Parallèlement, le lot « témoin » pâturera sa propre parcelle sans MSB. Ces séquences, avec un intervalle de deux semaines minimum, seront répétées 3 à 4 fois au cours de l'essai jusque les agneaux aient atteint leur poids d'abattage. Entre deux séquences, chaque lot pâturera une parcelle dite « intermédiaire » : prairie temporaire ou permanente sans espèces riches en MSB. Un suivi régulier de la charge parasitaire des animaux sera effectué ainsi que de leur performance pour s'assurer de la bonne santé des animaux.

La règle des 3R a été prise en compte durant toute la durée d'élaboration du projet et de cette demande, premièrement il n'est pas possible de remplacer l'animal dans cette étude car il n'existe pas de méthode alternative fiable pour valider nos objectifs scientifiques. Deuxièmement les effectifs animaux ont été limités et réduits au maximum tout en permettant d'obtenir des résultats fiables (12 mâles et femelles par traitement). Troisièmement, tout est mis en œuvre pour raffiner les procédures expérimentales en limitant leur nombre (2) essentielles pour le suivi de la charge parasitaire des animaux et peu invasives. Pour prendre en compte au mieux, les besoins physiologiques et sociaux des agneaux, ainsi que leur bien être ceux-ci sera conduits en lots et disposeront d'abris durant la durée de l'expérimentation. De plus, les animaux seront suivis quotidiennement pour s'assurer de leur bonne santé.

12080 Le cancer du sein est le cancer féminin le plus diagnostiqué en France et dans le monde. Avec environ 54 000 nouveaux cas et 12 000 décès par an, le cancer du sein se situe au 2e rang des cancers et au 3e rang de la mortalité par cancer.

La prise en charge globale impose dans approximativement 30 % des cas une mastectomie totale en première intention, augmentant annuellement de 18000 le nombre de femmes françaises susceptibles de bénéficier d'une reconstruction mammaire. Néanmoins, selon les différentes études épidémiologiques, moins de 30% en bénéficieront. Cette faible proportion est plurifactorielle. Elle peut être liée à la méconnaissance des différentes techniques, la peur de complications, la peur d'être déçue, la douleur, l'âge, des raisons médicales, des raisons financières, démographiques ou pour certaines à leur mauvaise réputation.

La reconstruction mammaire restaure un volume après mastectomie partielle ou totale, soit de manière immédiate, dans le même temps opératoire que l'exérèse tumorale, soit de manière différée, en attendant un an après la fin des traitements adjuvants. Plusieurs traitements chirurgicaux peuvent être proposés : la plus connue est la prothèse de silicone qui reste un corps étranger qu'il faut changer régulièrement. L'alternative est le lipofilling : un remplissage progressif des zones délaitées grâce à des cellules adipeuses provenant de la patiente. Cependant, la survie cellulaire ne dépasse pas 70 %, faute de vascularisation et reste relativement lourde car nécessite plusieurs interventions chirurgicales.

L'objectif de notre projet est d'améliorer la méthode actuelle, en créant une structure transitoire associant tissu autologue et matière synthétique ne nécessitant qu'une seule intervention « définitive ». Il s'agit d'un projet susceptible d'apporter une innovation majeure dans l'arsenal thérapeutique actuel de la chirurgie plastique et reconstructrice et de changer la pratique à l'échelle mondiale.

Notre projet a pour but d'améliorer et de valider cette nouvelle prothèse, afin de trouver le design et le composant résorbable idéal pour permettre la reconstruction d'un tissu autologue comblant l'espace défini par la prothèse (environ 200ml), à partir d'un lambeau adipeux de faible volume. Plusieurs études seront menées dans cet objectif afin de définir dans un premier temps le volume du lambeau garantissant une croissance optimale ainsi que l'impact de la vascularisation puis de tester différentes topologies, différents matériaux, l'ajout d'hydrogel ou d'un scaffold afin d'optimiser la prothèse avant le passage en phase clinique. Afin de tester les différentes modalités de la prothèse, le volume du lambeau initial et l'impact de la vascularisation sur la croissance du lambeau plusieurs études seront menées sur 100 rats puis 40 minipigs sur 5 ans. Ces études permettront

également de démontrer que cette nouvelle technique de reconstitution mammaire est efficace et non toxique.

Les prothèses seront implantées par une intervention chirurgicale sous anesthésie générale en sous cutané. Lors de l'intervention chirurgicale, dôme et socle sont assemblés autour d'un lambeau adipeux vascularisé de l'hôte, créant ainsi une "prothèse" qui deviendra physiologique après dégradation du matériau synthétique. Les animaux seront ensuite suivis quotidiennement pour détecter tout signe de douleur et traiter tout signe de douleur.

L'évolution du tissu dans la chambre prothétique sera suivie par IRM sous anesthésie, durant plusieurs mois, afin de déterminer la cinétique de croissance du lambeau adipeux mais également la cinétique de résorption de la prothèse. Des prises de sang seront également réalisées une fois par mois afin de suivre l'inflammation systémique des animaux. Dans un second temps, les prothèses seront également explantées à différents time points afin de déterminer l'effet du corps sur leurs propriétés mécaniques. Ce protocole nous permettra ainsi de réaliser à mesure des profils de résorption et de diminution des propriétés mécaniques en fonction de la durée nécessaire pour l'expansion tissulaire.

Le projet a été établi en respectant la règle des "3R" :

Le REMPLACEMENT : Le modèle animal est essentiel pour cette étude car il nous permet d'observer la croissance du lambeau adipeux in vivo et de tester différentes modalités avant de passer chez l'humain. Il nous permet également d'acquérir des connaissances sur la dégradation du polymère, la toxicité et les effets secondaire. Ces données ne peuvent être obtenues que par l'implantation du dispositif in vivo.

La REDUCTION : nous avons réduit au minimum le nombre d'animaux utilisés en leur implantant plusieurs prothèses afin d'obtenir des tracés suffisamment précis pour être exploitables et permettre la mise en évidence les différences de traitements. Le fait de mettre en place un suivi de l'évolution du tissu et de la prothèse par IRM permet également d'effectuer un suivi longitudinal de la croissance du lambeau et donc de diminuer le nombre d'explantation et donc d'animaux utilisés dans chaque étude.

Le RAFFINEMENT a été au cœur de l'élaboration du projet avec notamment la détermination des points limites et l'optimisation de l'hébergement en lien avec le responsable du bien-être animal de l'établissement. Grâce à une bonne prise en charge de la douleur, aucun test chez l'animal n'est douloureux au sens réglementaire du terme, c'est-à-dire qu'aucun geste n'a de répercussions supérieures à celles induites par une aiguille sous cutanée. La technique de suture des animaux sera constamment améliorée afin de diminuer les risques de rupture et donc de souffrance et de perte d'animaux.

12081 Le principal récepteur des produits de glycation avancée (RAGE pour receptor for advanced glycation end products) est un récepteur membranaire particulièrement exprimé à la surface des cellules endothéliales. Son activation par différents ligands stimule des voies de signalisation proinflammatoires et prothrombotiques. Plusieurs études ont ainsi montré son implication dans des maladies inflammatoires vasculaires chroniques comme le diabète ou l'athérosclérose. Son rôle en situation aiguë, comme dans les microangiopathies thrombotiques (MAT) reste par contre à définir. Les MAT sont définies par l'oblitération par des thrombi fibrino-plaquettaire de microvaisseaux et s'associent à une hémolyse mécanique et une souffrance d'organe en aval du lit vasculaire concerné. Différentes pathologies endothéliales inflammatoires aiguës telles que le syndrome hémolytique et urémique, le purpura thrombotique thrombocytopénique ou encore le syndrome des anti-phospholipides peuvent s'exprimer sous forme de MAT, favorisée par l'hémolyse elle-même ou encore une agression directe par des auto-anticorps.

L'objectif de ce projet est de déterminer, dans des modèles murins mimant ces situations l'implication du RAGE dans l'acquisition d'un phénotype endothéliale prothrombotique et proinflammatoire ainsi que l'utilisation thérapeutique d'inhibiteurs du RAGE dans la prévention de cette inflammation. Des souris de fond génétique C57bl6 invalidées ou non pour le RAGE seront exposées à des conditions induisant/mimant l'hémolyse, en présence plus ou moins d'anticorps

anti-phospholipides (APL). Les effets en termes de dysfonction d'organe seront alors évalués. Puis, une intervention thérapeutique utilisant des inhibiteurs du RAGE sera mise en place chez des souris de fond génétique C57bl6 chez lesquelles une souffrance d'organe aura été induite.

Ce projet visant à étudier le rôle du récepteur RAGE dans un contexte physiopathologique complexe ne permettra pas de remplacer le modèle animal. En fonction des résultats expérimentaux obtenus et de la réplication des résultats positifs, un maximum de 1848 souris sera utilisé. Dans un processus de réduction d'animaux en expérimentation, nous avons inclus dans le protocole le minimum d'animaux permettant de garder une puissance statistique suffisante dans le traitement des résultats. Pendant toute la durée du protocole, les animaux seront suivis pluri-quotidiennement afin d'identifier des signes éventuels de souffrance et leur poids évalué quotidiennement. L'apparition de signes de souffrance (prostration, vocalisation, tremblement) ou une perte de poids supérieure à 20% sera considérée comme point limite et entrainera l'euthanasie de l'animal concerné. Les souris seront hébergées par groupes de 6 animaux par cage. Elles seront manipulées par du personnel formé et expérimenté afin de réduire leur stress pendant l'expérimentation.

12082 La radiothérapie externe est une thérapie de référence pour le traitement des tumeurs solides. Elle a pour but d'éliminer la tumeur dans le champ d'irradiation en créant des dommages cellulaires et tissulaires, entraînant la mort ou l'arrêt définitif des cellules tumorales. En plus des effets directs sur les cellules tumorales, les données récentes dans la littérature scientifique font état d'un rôle important du microenvironnement dans la réponse à l'irradiation. En effet, pour être pleinement efficace, la radiothérapie nécessite la présence d'oxygène, qui participe aux réactions physico-chimiques à l'origine des dommages cellulaires. La fonctionnalité des vaisseaux sanguins intratumoraux est donc essentielle en permettant la diffusion de l'oxygène. Il a été montré récemment que la radiothérapie externe conduit à une amélioration de la perfusion, une augmentation de l'oxygénation et une meilleure distribution de chimiothérapie dans le tissu tumoral. Ce phénomène est accompagné du recrutement de péricytes, c'est-à-dire de cellules entourant les cellules endothéliales qui constituent les vaisseaux sanguins. Cependant, le rôle réel de ces péricytes dans la réponse du tissu tumoral à l'irradiation reste totalement inconnu. Nous souhaitons donc déterminer la contribution des péricytes dans la croissance tumorale et la réponse vasculaire à la radiothérapie externe. Pour ce faire, nous utiliserons un total de 330 animaux dans un modèle transgénique de déplétion péricytaire. Des tumeurs mammaires "4T1" seront greffées dans la glande mammaire de souris de souche BALB/c (même fond génétique que la tumeur) modifiées génétiquement pour permettre l'élimination des péricytes au temps voulu (PDFGRb-TK). Ce modèle permet de tuer sélectivement les péricytes seulement lorsque les animaux sont traités au ganciclovir. Dans un premier temps, des expériences pilotes serviront à déterminer quel schéma d'irradiation est approprié pour ce modèle. Dans un deuxième temps, des expériences pilotes serviront à déterminer quel schéma de dose de ganciclovir est le plus approprié pour éliminer le recrutement des péricytes induit par la radiothérapie. Dans un troisième temps, les souris seront traitées suivant les schémas sélectionnés (radiothérapie et ganciclovir), et on cherchera à évaluer l'effet de l'absence des péricytes sur la croissance des tumeurs et sur les paramètres tissulaires vasculaires (vascularisation, perfusion, hypoxie). Les groupes seront constitués de 10 animaux et chaque expérience sera réalisée trois fois afin de vérifier la reproductibilité et d'obtenir une significativité statistique.

Réduction: une stratégie de réduction sera mise en place au cas où la significativité serait atteinte dès deux expériences, auquel cas l'expérience ne sera pas reproduite une troisième fois. Egalement, le nombre d'animaux par lot a été optimisé en fonction des expériences précédentes. Raffinement: pour leur confort, les animaux seront hébergés en groupes invariables (5 par cage max.) avec enrichissement et surveillance active. Les greffes seront réalisées sous anesthésie générale avec analgésique en pré et post-opératoire. Remplacement: les paramètres étudiés ne peuvent pas être remplacés par des procédures in vitro car ils mettent en jeu des cellules d'origine diverse (moelle osseuse, tissu adipeux, rate...) et relèvent de la physiologie générale.

12083 Dans le contexte de la réduction de l'utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire et afin de limiter l'émergence de la résistance bactérienne, le développement de stratégies destinées à réduire la consommation antibiotique est fortement encouragé. Le composé C est une molécule chimique, d'origine naturelle, n'étant dotée d'aucune activité antibiotique propre mais présentant des effets synergiques intéressants in vitro lorsqu'elle est associée à certains antibiotiques, tels que l'amoxicilline. Ainsi, l'association amoxicilline + composé C est plus active que l'amoxicilline seule sur un large panel de souches de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) d'origine vétérinaire testées in vitro. Toutefois, l'activité potentiatrice du composé C n'a, pour l'heure, pas été étudiée in vivo dans des modèles d'infection.

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'effet synergique du composé C chez la souris dans un modèle d'infection bactérienne aiguë (septicémie) à *S. aureus*.

Trois phases sont prévues pour chacun de ces deux modèles :

1- Phase pilote chez l'animal infecté non traité afin de mettre au point le modèle de septicémie et de déterminer la dose létale 100 (DL100) de la souche de *S. aureus* d'intérêt ;

2- Phase pilote chez l'animal traité par le composé C seul ou par antibiotique seul (contrôle positif) ; cette étape permettra d'appréhender les doses/rythme d'administration efficaces (restauration de la survie à 100% dans le modèle septicémie) ;

3- Phase d'efficacité chez l'animal infecté et traité soit par antibiotique seul, soit par l'association de l'antibiotique / composé C à différentes doses ; cette phase permettra de conclure sur l'existence ou non d'une synergie entre ces deux traitements, et ainsi d'envisager de réduire les doses d'antibiotique utilisées.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 8 par groupe (au lieu de 10) grâce à l'expérience acquise lors d'études précédentes. Des analyses in vitro ont déjà été réalisées sur l'efficacité du composé C. Toutefois l'efficacité de tels composés ne peut être confirmée que dans des modèles pré-cliniques (notamment pour des aspects de diffusion tissulaire), c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée. Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance biquotidienne sera également réalisée pour cette étude. Des points –limites sont établis pour éviter toute souffrance des animaux (raffinement).

252 souris CD1 sont nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet. Une analyse rétrospective sera réalisée à la fin du projet.

12084 L'alimentation des taurillons en phase d'engraissement est classiquement composée d'ensilage, de céréales et d'un « correcteur azoté », aliment riche en matière azotée nécessaire à l'équilibre et au fonctionnement de l'écosystème ruminal. Le correcteur azoté est généralement apporté sous forme de tourteau dont une fraction peut être remplacée par de l'urée. Les tourteaux représentent la partie la plus onéreuse de la ration, et ont un impact écologique négatif lorsqu'il s'agit de tourteaux importés. Une entreprise d'agrofourmiture française propose un nouvel aliment produit localement qui pourrait venir en remplacement d'une partie du tourteau de la ration. En plus des apports nutritionnels attendus, ce correcteur pourrait avoir un impact positif sur la santé des taurillons, en particulier sur leur écosystème ruminal, et sur la digestibilité de la ration. Le présent projet vise à déterminer si la substitution d'une fraction azotée de la ration par le produit testé permet d'améliorer le fonctionnement de l'écosystème ruminal et la digestibilité de la ration.

Les bovins inclus dans l'étude sont huit taurillons charolais répartis en quatre groupes de deux individus afin de tester la substitution d'une partie du tourteau de la ration par le produit testé et deux types d'urée. Les taurillons reçoivent donc à tour de rôle quatre régimes différents. L'étude est composée de quatre périodes de trois semaines. Dans le schéma expérimental utilisé, chaque taurillon est son propre témoin puisque chaque paire teste les quatre régimes dans un ordre différent. Ce dispositif permet d'utiliser un nombre minimal d'animaux tout en ayant la puissance statistique requise. En effet, les bovins sont conduits en conditions contrôlées et uniformes afin de minimiser les variations liées à l'environnement. Cela permet de répondre au principe de réduction

du nombre d'individus utilisés. Le remplacement du bovin par un autre modèle animal ou par un essai in vitro ne permettrait pas d'obtenir des résultats utilisables chez le bovin à l'engraissement.

Les prélèvements nécessaires à l'évaluation des modifications de l'écosystème ruminal ont lieu le dernier jour de chaque période expérimentale. Ils sont donc séparés de trois semaines. Ces prélèvements sont réalisés en cinétique, c'est-à-dire qu'il y en a quatre par journée de prélèvement afin d'observer les variations dans les neuf heures suivant le repas. Ils consistent en un prélèvement de contenu ruminal par sondage. Concomitamment des prélèvements sanguins sont réalisés via la veine jugulaire afin d'évaluer le métabolisme azoté. De plus des fèces sont récoltées au sol pour le suivi de marqueurs de la santé digestive et le calcul de la digestibilité de la ration. Dans une optique de raffinement, les bovins sont manipulés dans un couloir adapté à leur contention pour éviter tout risque de blessure. La collecte de contenu ruminal est un geste couramment réalisé par les éleveurs qui ne nécessite pas d'analgésie ou de sédation. Afin de respecter leur bien être, les animaux sont logés par deux dans quatre cases voisines avec une litière de paille d'orge afin de maintenir les relations sociales entre animaux. Au quotidien, le personnel animalier observe le comportement de chaque taurillon le matin au moment de la distribution du repas afin de repérer les signes de mal-être ou de souffrance. Ces signes inhabituels sont immédiatement signalés au responsable de l'expérimentation. Ces animaux seront soignés et si jugé nécessaire par le vétérinaire traitant retirés de l'essai.

12085 Les Désordres du Spectre Autistique (DSA) ont une incidence de 1/100 à 1/200. Ce sont des troubles neuro-développementaux impliquant des anomalies de la communication, des comportements répétitifs et une restriction du champ d'intérêt. Ils se manifestent avant trois ans, comme l'établit le Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5, publié en 2013). Ces troubles sont associés à environ 170 maladies génétiques rares. Leurs causes sont multiples ainsi que leurs patho-physiologie. Il est donc vain de chercher un traitement unique. On doit s'orienter vers la mise en place de traitements adaptés à chaque étiologie. Ceci implique l'identification de chaque cause et la compréhension des processus physiologiques qui sont liés. Parmi celles-ci, une délétion du gène TSHZ induit des DSA chez 17 sur 21 patients observés. Dans ce travail, on projette de reproduire cette délétion chez la souris. Compte tenu de la similitude quasi complète entre le gène humain et celui de la souris (99,98%), on est en mesure d'attendre une confirmation de la liaison entre une délétion de ce gène et l'émergence de traits de type autistique. En outre, les modèles ainsi générés serviront à la mise à l'épreuve de traitements pharmacologiques destinés à réduire l'incidence de ces traits, d'abord chez la souris avant d'envisager des traitements chez les patients porteurs de délétion de TSHZ. Le recours à des animaux vivants est impératif dans la modélisation de cette pathologie. En effet, les troubles autistiques, depuis leur description princeps en 1943 n'ont pu faire l'objet que de définitions en termes de comportement. Si des associations entre gènes et DSA ont été établies, on ignore tout des circuits cérébraux sous-jacents. Qui plus est, ces circuits ne sont pas les mêmes suivant l'évènement génétique qui est à l'origine de la maladie. Outre ces événements que ce projet contribue à identifier, il est donc nécessaire d'identifier les perturbations des circuits neuronaux associées ainsi que les processus conduisant aux traits comportementaux mesurés. L'analyse des circuits neuroniques, pour TSHZ, a fait l'objet d'une demande d'autorisation de projet. La présente demande ne traitera pas ces aspects et portera sur les seules mesures comportementales. Le projet présenté ici utilise des techniques d'observation non invasives lors de situations se rapprochant le plus possibles des conditions de vie de la souris. Nous nous sommes attachés à ce que les conditions d'hébergement ne génèrent pas de stress. Pour cela, outre un tapis de sciure dépoussiérée, chaque cage contient un abri de carton qui peut être rongé et est aussitôt remplacé. Les manipulations lors des changements de cages ne sont pas faites par des animaliers mais par le chercheur en charge du projet. Les conditions d'hébergement et les traitements appliqués ne génèrent aucune souffrance et aucun stress.

Ce projet applique la règle des 3 R à la population expérimentale sélectionnée.

Raffiner : les manipulations, qu'il s'agisse des changements de cages ou des expériences seront effectuées par un expérimentateur qualifié. Compte tenu de la grégarité des individus de l'espèce,

nous proscrirons tout isolement (les souris sont groupées et ce dès le sevrage pour éviter l'établissement de relations agonistiques).

Réduire : l'effectif est calculé préalablement à l'expérimentation de sorte que l'effectif ne dépasse pas les besoins statistiques requis. Nous utiliserons un effectif de 14 mutants et 14 témoins par lignée induite soit un total de 112 (28 x 4) souris mâles pour l'ensemble des 4 lignées

Remplacements : l'étude des corrélats neuroniques (neurochimiques et protéomiques) qui sont menés sur des prélèvements post mortem devraient ouvrir la voie à une possible analyse in silico.

12086 La possibilité d'inactiver des gènes chez la souris permet d'établir de nouvelles lignées de souris mutantes. Ces lignées représentent un modèle de choix pour des études de génétique fonctionnelle. Elles permettent d'accéder à la fonction d'un gène in vivo au cours du développement de l'individu jusqu'à son vieillissement. Pour certains gènes, les fortes similitudes entre les séquences géniques de l'homme et de la souris permettent une extrapolation des données obtenues chez la souris à la physiologie humaine.

Le projet utilise des souris transgéniques invalidées pour le gène *Asf1b* qui code une chaperonne d'histones impliquée dans la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN. L'expression spécifique d'*Asf1b* dans les cellules germinales (ovocytes et spermatozoïdes) et l'hypofertilité des femelles déficientes motivent l'étude du rôle de cette chaperonne dans le maintien de la stabilité génétique, dans la gestion des cassures double-brin de l'ADN et dans la transmission épigénétique à la descendance. Les individus invalidés sont viables et capables de se reproduire. Cependant chez les femelles gestantes *Asf1b* déficientes, des défauts de développement et des létalités sont observées à mi-gestation, dont on ignore s'ils sont ou non corrélés à la qualité intrinsèque des gamètes.

Afin d'apporter de nouvelles connaissances sur la fonction du gène *Asf1b*, ce projet de recherche vise à élucider son rôle dans les cellules progénitrices de la lignée germinale, mâle et femelle au cours de la différenciation cellulaire. Le testicule est le tissu chez l'adulte où le gène *Asf1b* s'exprime le plus fortement chez l'homme et la souris. Ces similitudes sont partagées avec d'autres mammifères et pourraient refléter une fonction conservée au cours de l'évolution.

Pour évaluer la fonction d'*Asf1b* dans le maintien de la stabilité génétique, nous projetons d'utiliser les rayonnements ionisants pour induire des cassures double-brin dans l'ADN des cellules germinales. La réponse aux dommages sera suivie à court terme (heures), à moyen terme (jours) et à long terme (semaines) afin de mesurer l'impact sur la différenciation cellulaire.

Une exposition unique aux rayons gamma (dose maximum 2 Gy) a été choisie. Chez la souris sauvage, l'irradiation déclenche une réponse inflammatoire immédiate et modérée, mais pas de signe clinique d'inconfort observable dans les heures et les jours qui suivent l'irradiation. Compte-tenu des connaissances acquises sur les souris mutantes *Asf1b*, une réponse identique à celle des souris sauvages est attendue. Toutefois chez les mutants, la conduite de l'étude à long terme sera conditionnée par les résultats obtenus à court et à moyen termes, afin de prévenir la survenue éventuelle d'effets physiopathologiques délétères.

Dans toutes les expériences, les cellules germinales seront irradiées à différentes étapes du développement de la gonade : embryonnaire, juvénile et adulte.

Les conséquences de l'irradiation seront suivies avec la mise en œuvre de protocoles utilisés en routine au laboratoire, incluant des approches histologiques (immunomarquage sur coupes de tissu) et des analyses cellulaires (cytométrie en flux).

Le nombre d'individus nécessaires à cette étude (tous les âges confondus) s'élève à 256 pour un projet dont la durée est estimée à cinq ans. Ces chiffres ont été déterminés par deux impératifs, disposer de résultats expérimentaux statistiquement robustes et réduire au maximum le nombre d'individus.

Cette lignée de souris est unique. Les animaux sont étroitement surveillés tout au long des expériences. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation.

L'environnement des souris est également enrichi à l'aide de coton de nidification et de tube « igloo » en carton. Des points limites ont été mise en place.

12087 Les chimiothérapies contre les cancers dits « solides » (colon, poumon par exemple) ont rarement des effets efficaces à long terme et de nombreuses rechutes sont observées. Par ailleurs, ces thérapies sont extrêmement toxiques car elles ne sont pas spécifiques des cellules tumorales. A l'inverse, notre propre système immunitaire est capable de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales avec en théorie, une protection à long terme. Par conséquent, la modulation du système immunitaire pour induire des régressions tumorales représente un formidable espoir thérapeutique pour de très nombreux patients.

Ce projet a pour objectif d'étudier comment les cellules immunitaires migrent et coopèrent in vivo pour rejeter une tumeur. Il est possible d'induire des régressions tumorales chez la souris et d'étudier quelles sont les coopérations cellulaires qui régissent ces réponses immunitaires efficaces. Seule l'expérimentation in vivo sur les souris, mimant fidèlement le microenvironnement tumoral et intégrant l'ensemble du système immunitaire, nous permettra de répondre à cette question.

La capacité de ces cellules à migrer et à s'activer sera donc étudiée. La migration de cellules immunes (en particulier les cellules dendritiques et les lymphocytes T) issues de souris génétiquement modifiées qui ne présentent pas de phénotype dommageable sera étudiée grâce à des expériences de transfert de cellules dans une souris hôte. Une approche alternative consistera à injecter des souris avec un composé pharmacologique dont l'activité in vivo a été décrite dans de nombreuses études sur le diabète sans nocivité pour les animaux aux doses employées, afin de déterminer s'il est capable de favoriser des régressions tumorales en augmentant l'activité cytotoxique des lymphocytes T contre les cellules tumorales. Les régressions tumorales seront induites par traitement avec un vaccin. Des prélèvements de tumeurs et de ganglions seront réalisés post-mortem afin d'étudier la cinétique de recrutement des cellules immunes. Cette étude nécessitera 490 souris pour une période totale de 5 ans.

Pour respecter le principe des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner), des paramètres expérimentaux tels que le type cellulaire et le nombre de cellules nécessaires à l'implantation ont déjà été déterminés dans d'autres projets afin de réduire le nombre d'animaux utilisés ici, tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants et une bonne reproductibilité. Pour éviter toute souffrance et angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront sous une surveillance journalière par les animaliers et les expérimentateurs, et des antalgiques sont prévus si nécessaire. Les procédures de prélèvements sanguins en particulier se feront sous anesthésie générale. Les cellules tumorales injectées restent localisées au site d'injection et ne sont pas invasives. De plus, l'établissement de points limites avec un suivi quotidien nous permet de réduire au maximum la souffrance des animaux et de décider de la mise à mort anticipée d'une souris si nécessaire.

Les régressions tumorales induites par la stimulation du système immunitaire sont la preuve d'une réponse efficace contre la tumeur. Ces modèles murins nous permettront donc d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents afin de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

12088 La maladie d'Alzheimer (MA), une maladie neurodégénérative chronique, représente la cause la plus fréquente de démence chez les personnes âgées.

La protéine APP, présente naturellement dans le cerveau, est clivée selon deux voies :

- la voie non-amyloïdogénique qui est la voie physiologique et conduit à la sécrétion de l'APP alpha soluble (sAPP α). Le peptide sAPP α est un facteur de croissance neuronal. Il induit également une neuroprotection.

- La voie amyloïdogénique, qui est la voie pathologique, dans laquelle l'APP est clivée en b-CTF et APPb. L'APPb est ensuite coupé en peptide Ab.

C'est l'agrégation du peptide Ab qui forme les plaques amyloïdes, principales composantes des plaques séniles caractéristiques de la maladie d'Alzheimer

Alors que de nombreux gènes de susceptibilité pour la MA ont été répertoriés, le seul fortement confirmé comme facteur de risque est l'apolipoprotéine E (APOE). Il existe 3 allèles codant pour la protéine APOE :

- APOE3 est neutre,
- APOE4 considéré comme favorisant le risque de développer la MA,
- APOE2 considéré comme protecteur de la MA.

Des preuves solides suggèrent que APOE2 diminue la neuropathologie liée à la MA et réduit le déclin cognitif lié à l'âge. L'influence de l'APOE sur la MA semble liée à ses effets sur le métabolisme de l'Ab.

Notre objectif est de développer une nouvelle approche thérapeutique dans la MA visant à surexprimer la protéine sAPPa ou la protéine APOE2, en utilisant comme véhicule des cellules sanguines des souris (CSH). Ces cellules peuvent en effet être génétiquement modifiées ex vivo pour exprimer un gène thérapeutique. Elles peuvent être ensuite réinjectées chez l'animal (modèle de la MA), après un traitement qui détruit la moelle. Les cellules ainsi injectées reconstitueront le système hématopoïétique des animaux hôtes et après passage de la barrière hémato-encéphalique, pourront se différencier localement pour exprimer et sécréter la protéine sAPPa ou la protéine APOE2.

Nous évaluerons ensuite les dépôts d'Ab (et ses dérivés), la neurodégénérescence par l'évolution comportementale de ces animaux. Ce projet a pour but d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette approche dans le but de diminuer la pathologie liée à l'accumulation de l'Ab.

Le recours à l'animal est nécessaire car aucun milieu de culture ou système synthétique ne peut aujourd'hui reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau, et en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles. Les 680 rongeurs étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et ont été élevés en captivité dans des établissements reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des rongeurs hébergés en groupe garantissent le bien-être des animaux.

12089 Depuis quelques années, on observe dans les domaines de santé humaine ou de santé animale un développement important de biosenseurs automatiques et intégrés permettant de mesurer en continu de paramètres biologiques importants pour connaître l'état de santé des individus appareillés. L'utilisation de telles approches dans l'élevage des poissons constitue maintenant un enjeu important. L'enjeu est non seulement en termes de suivi fin de l'état de santé des animaux mais aussi pour favoriser le développement de conditions plus éthiques en expérimentation animale (réduction du nombre d'animaux utilisés, suivi du bien-être des poissons). De plus, si ce biosenseur est placé sur l'opercule du poisson, il pourrait fournir une mesure directe de l'activité et de la fréquence respiratoire du poisson. Ces informations sont envoyées par radio-transmission à un récepteur situé à proximité des poissons. Des essais pour un nouveau biosenseur ont déjà été réalisés avec succès chez le bar et la daurade. Pour pouvoir utiliser ce matériel chez la truite, il faut au préalable mettre au point une technique permettant d'accrocher ce biosenseur sur le poisson. L'objectif de cette demande est de tester différentes techniques d'accrochage chez la truite: ces techniques doivent à la fois être respectueuses du bien-être du poisson et de son état de santé.

Nous proposons de tester les 4 techniques suivantes:

- 1) Attacher le biosenseur avec de la colle sur un morceau de plastique lui-même suturé sur l'opercule avec un fil chirurgical.
- 2) Attacher avec de la colle le biosenseur sur une agrafe métallique elle-même accroché sur l'opercule.
- 3) Attacher avec de la colle le biosenseur sur un morceau de plastique lui-même suturé à la base de la nageoire dorsale avec un fil chirurgical.
- 4) Implantation du biosenseur dans la cavité ventrale du poisson.

Pour les protocoles 1) et 2), la suture du morceau de plastique avec le fil chirurgical ou la pose de l'agrafe se fera une semaine avant le collage du biosenseur sur le support. Une évaluation de la cicatrisation de l'opercule aura lieu juste avant la pose du biosenseur. Les protocoles 3) ou 4) (qui ne permettent pas d'enregistrer les déplacements de l'opercule) ne seront retenues, au final, que si les méthodes 1) ou 2) ne sont pas acceptables. Dans le doute, nous testons dès maintenant toutes les solutions possibles.

Les poissons sur lesquels les biosenseurs auront été accrochés ou implantés seront suivis individuellement pendant 4 semaines et différents paramètres biologiques permettant de caractériser l'état de santé et le bien-être des poissons seront suivis. Ceci inclut en particuliers l'observation du comportement et de l'intégrité corporelle, le suivi des performances de croissance, la recherche de signes de d'inflammation et de nécroses autour de la zone de fixation des biosenseurs. A la fin du protocole des analyses histologiques seront aussi réalisées sur des tissus prélevés (branchies, peau).

Le nombre total de truites utilisées pour cette étude sera de 100 poissons (20 poissons par traitement). Le projet prend en compte la règle éthique des 3R :

Remplacer : Il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car le but du projet est de tester sur des poissons vivants une technique d'accrochage de biosenseurs.

Réduire : Le nombre de poissons utilisés est adapté au plus juste pour permettre une évaluation statistique de la variabilité individuelle de la réponse à l'accrochage du biosenseur.

Raffiner : les informations sur ces paramètres biologiques seront réalisées sur des poissons vivants (comportement) ou anesthésiés (poids, intégrité corporelle, recherche d'inflammation). Les prélèvements en fin d'expérience ne seront réalisés que sur des animaux euthanasiés et ce, dans les conditions réglementaires. Le protocole permettra de décider d'une interruption de l'expérimentation en cas de franchissement du point-limite. Les critères de franchissement des points limites seront les suivants: Si les poissons ne mangeaient plus ou avaient un comportement atypique tel que la nage sur le dos ou en vrille, une fuite anormale à l'alimentation, une léthargie, une hyperactivité locomotrice, l'expérimentation serait interrompue et les animaux concernés seraient euthanasiés. Les densités d'élevage des truites durant l'expérience sont très inférieures à celles utilisées en pisciculture de truite et la qualité d'eau, suivie de manière journalière, est ajustée très régulièrement en fonction des besoins des poissons. Le suivi journalier de la prise alimentaire et des mortalités permet d'assurer un élevage de qualité.

12090 Les troubles métaboliques tels que le diabète de type 2 constituent un grave problème de santé publique. Chez l'Homme, le diabète de type 2 est associé à un déséquilibre du microbiote intestinal (ensemble des bactéries du système digestif) et à une altération de la barrière intestinale (augmentation de la perméabilité et inflammation de très faible intensité). Chez la souris conventionnelle (c'est-à-dire pourvue de son microbiote intestinal naturel) de la lignée C3H/HeN, une séparation des souriceaux du reste de la portée et de leur mère pendant 3 heures par jour pendant 10 jours au cours des 15 premiers jours de vie induit chez la souris mâle devenue adulte (i) à l'âge de 50 jours, une altération de la barrière intestinale associée à un déséquilibre du microbiote, (ii) à l'âge de 350 jours, une intolérance au glucose associée à un déséquilibre profond du microbiote.

Le microbiote de souris ayant été séparées de leur mère et atteint l'âge de 350 jours a été conservé et transplanté oralement à des souris C3H/HeN dépourvues de microbiote depuis leur naissance (axéniques, élevées en isolateurs stériles) pour déterminer si le déséquilibre du microbiote intestinal à lui seul permet d'induire le développement de l'intolérance au glucose. Cependant, seule une partie des troubles du métabolisme a été retrouvée après 4 mois de colonisation.

Ce projet a pour but de déterminer la contribution de l'altération de la barrière intestinale à la survenue de l'intolérance au glucose. La perméabilité intestinale sera mesurée ex vivo chez des souris axéniques (âgées de 50 jours) ayant subi ou non un stress de séparation maternelle en période néonatale, en comparaison de souris conventionnelles (Etude 1, 4 groupes permettant de croiser les 2 facteurs pour savoir si le microbiote est requis pour que le stress néonatal altère la

barrière intestinale). Si cette étude indique que le stress de séparation maternelle induit une altération de la barrière intestinale chez la souris axénique, une 2^{ème} étude sera entreprise pour étudier l'effet de la combinaison « microbiote déséquilibré – barrière intestinale altérée » dans la survenue d'une intolérance au glucose. Des souris axéniques subiront ou non un stress de séparation maternelle en période néonatale, et chacun de ces 2 groupes sera réparti en 5 sous-groupes colonisés à l'âge de 50 jours, soit par le microbiote de souris conventionnelles ayant subi le stress de séparation maternelle et âgées de 50 jours (elles présentent une altération de la barrière intestinale) ou de 350 jours (elles présentent une intolérance au glucose), soit par le microbiote de souris conventionnelles n'ayant pas subi le stress de séparation maternelle et âgées de 50 ou 350 jours (elles n'ont ni altération de la barrière intestinale, ni intolérance au glucose), soit par le milieu de suspension du microbiote resté stérile.

La glycémie à jeun sera mesurée une fois par mois au cours des 4 mois suivant la colonisation et un test oral de tolérance au glucose sera effectué en fin d'expérience.

Le processus étudié fait intervenir de nombreuses interactions au sein de l'hôte et nous n'avons pas connaissance d'alternatives à l'utilisation de l'animal pour l'explorer. Sur la base de la variabilité interindividuelle des données obtenues pour la mesure de la perméabilité intestinale, le nombre d'animaux a été ajusté au strict minimum nécessaire pour l'analyse statistique, soit 12 mâles par groupe. L'étude 1 (4 groupes) nécessitera donc 24 souris conventionnelles et 24 souris axéniques. L'étude 2 (10 groupes), réalisée ou non en fonction des résultats de l'étude 1, nécessitera 120 souris mâles axéniques. Pour prendre en compte le risque de contamination accidentelle d'un isolateur, risque inhérent à ce type d'expérience, nous prévoyons 60 souris mâles supplémentaires pour recommencer si besoin une série, portant le nombre total d'animaux à 228. Etant donné que les mères dont la portée sera isolée subissent également un stress, et que ces portées stressées sont également constituées de femelles, le nombre total d'animaux concerné par ce projet s'élève donc à 380.

A chaque session de stress de séparation maternelle en isolateur, les souriceaux retrouveront la litière de leur portée au sein d'une cage compartimentée et chauffée placée dans un 2^{ème} isolateur relié au premier par une cloison amovible. Du papier absorbant humidifié placé sur les cages permettra de maintenir l'hygrométrie. Les animaux après sevrage seront hébergés en cages collectives de 3 ou 4 individus et leur bien-être sera amélioré par un enrichissement du milieu au moyen de papiers absorbants à déchiqueter pour construire un nid, de tunnels en carton et de buchettes de bois à ronger. L'eau et la nourriture seront disponibles à volonté. Les procédures mises en œuvre ne sont pas susceptibles de causer de douleur ou souffrance prolongée : le volume des prélèvements sanguins sera petit (maximum 2 gouttes, chacune inférieure à 0,5 µl) et pratiqué par du personnel expérimenté.

12091 La myopathie centronucléaire liée à l'X (XLCNM, X-linked centronuclear myopathy), également appelée myopathie myotubulaire, est caractérisée par une hypotonie néonatale sévère et un décès précoce. C'est la plus commune et la plus sévère des myopathies centronucléaires, pathologies congénitales très sévères caractérisées par une faiblesse musculaire, une forte atrophie et des anomalies de la structure des fibres musculaires. La XLCNM est engendrée par des mutations du gène codant pour la myotubularine (MTM1), une phosphoinositide phosphatase. Sur cette base, un modèle murin Mtm1 knockout (délétion de l'exon 4) hémizygotes (Mtm1-/y) a été créé. Il permet de reproduire le phénotype provoqué par la XLCNM avec des caractéristiques histologiques classiques de cette pathologie comme une position anormale des organelles, un défaut de localisation des noyaux et une atrophie musculaire, associées à une faiblesse musculaire progressive, conduisant à la mort des animaux entre 6 et 14 semaines.

Pour comprendre le rôle physiologique du gène Mtm1, et comment ses mutations sont responsables de ces pathologies, selon le principe des 3R et pour satisfaire au remplacement, des modèles cellulaires ont d'abord été utilisés. Les modèles cellulaires bien que permettant de réduire l'utilisation des animaux, atteignent rapidement leurs limites car ils ne rendent pas compte des interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme. Afin d'obtenir des informations sur le rôle de cette protéine chez l'Homme et notamment au cours du développement de la XLCNM,

comme il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de tenir compte de toute la complexité et de toutes les interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme, le recours à un modèle animal apparaît comme la meilleure alternative pour étudier les fonctions de la protéine Mtm1. Le modèle murin Mtm1-/-, précédemment généré, est donc indispensable pour comprendre, in vivo, le rôle de Mtm1 dans ces pathologies, ses interactions, dans le muscle sain et pendant le développement des pathologies musculaires. De plus, la réalisation de ce projet pourrait permettre la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. L'objectif de cette étude est donc de poursuivre la caractérisation de la lignée Mtm1-/- (tests phénotypiques pour évaluer les fonctions musculaires des animaux : mesure de la force du corps, de la coordination motrice, de l'endurance et de la résistance à la fatigue ...) et de tester l'éventuelle amélioration du phénotype de ces animaux grâce à différentes approches thérapeutiques.

Afin de satisfaire aux principes des 3R, le phénotype des souris sera analysée in vivo / in situ et les tissus seront prélevés sur ces mêmes animaux pour des expériences in vitro ultérieures. Plusieurs procédures expérimentales (maximum une par jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (principe de réduction). Quinze souris seront utilisées par groupe pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Dans le cadre du raffinement, et afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, elles seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé.

Dans ce contexte, notre intervention aura pour objectifs de mettre en place des stratégies permettant de garantir la pérennité du modèle murin Mtm1-/. En effet, nous évaluerons la fertilité des mâles hémizygotés et en fonction des résultats obtenus nous mettrons en place une stratégie de cryoconservation de la lignée par le sperme ou sous forme d'embryons. Afin de garantir un statut sanitaire sain (SPF) pour ces animaux, si le sperme des mâles hémizygotés est fertile, la lignée sera revitalisée par fécondation in vitro (FIV), dans le cas contraire, une décontamination par transfert d'embryons issus d'accouplements naturels entre des femelles hétérozygotes et des mâles wild type sera réalisée.

Lors des croisements permettant d'amplifier la colonie, le recours aux femelles Mtm1 hétérozygotes ne présentant pas de phénotype particulier pour transmettre la mutation, nous permettra de réduire au maximum l'utilisation des mâles Mtm1-/- dont le phénotype est délétère.

Un des objectifs de notre action est de satisfaire la règle des 3R dans le cadre de laquelle s'inscrivent les procédures de cryoconservation et de décontamination par transfert d'embryons. En effet, la cryoconservation est une technique qui permet non seulement de réduire l'utilisation d'animaux vivants dans les échanges de modèles entre instituts ou centres de recherche mais aussi de sécuriser ceux-ci sur la maîtrise des conditions sanitaires lors des échanges. De plus, la technique de transfert d'embryons permet l'acquisition d'un statut sanitaire de haut niveau, mais aussi de réduire de façon conséquente la part d'animaux utilisés lors de la phase d'élevage des animaux utilisés en expérimentation. D'un point de vue pratique, le bien-être des animaux sera respecté tout au long du projet, répondant ainsi au besoin de raffinement décrit dans la règle des 3Rs. Les transferts d'embryons sont réalisés sous anesthésie générale suivie d'une surveillance renforcée des animaux. Cette procédure est appliquée sur l'ensemble de nos projets. Cette technique est aujourd'hui une des bases de la maîtrise du nombre d'animaux utilisés lors de la phase de production des lots destinés à l'expérimentation.

Dans le cadre de ce projet, et pour satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique des cages, et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances régulières nous permettront d'identifier d'éventuelles souris souffrantes et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, aliment spécifique et mise à mort dans les cas les plus graves).

Pour la réalisation de ce projet, nous hébergerons et générerons, en fonction de la fertilité des mâles hémizygotés au maximum 8500 souris sur une durée de 5 ans. La règle de la réduction sera appliquée en produisant uniquement le nombre d'animaux requis pour les expériences.

12092 L'adénocarcinome pancréatique est la quatrième cause de décès par cancer dans les pays occidentaux. Il est caractérisé par un pronostic sombre (4% de survie à 5 ans). Dans 80 % des cas, les patients sont inopérables au diagnostic et la chimiothérapie est alors le seul traitement. Malheureusement, on observe une rapide chimiorésistance de ce cancer chez les patients. En pratique clinique, la prise en charge des patients ne prévoit pas l'analyse des tumeurs avant et après chimiothérapie d'un point de vue moléculaire. Cette analyse est pourtant indispensable afin de comprendre les mécanismes de chimiorésistance et de pouvoir proposer aux patients des traitements plus adaptés et plus efficaces. Nous proposons donc d'établir un modèle de chimiorésistance acquise, chez l'animal, à partir de tumeurs pancréatiques humaines obtenues après chirurgie puis greffées en sous-cutanée chez la Souris et traitées par chimiothérapie (gemcitabine et FOLFIRINOX) dans des conditions équivalentes à la pratique clinique. Ce projet a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés à la chimiorésistance in vivo. Les retombées de ce projet fondamental permettront d'apporter aux cliniciens de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux biomarqueurs permettant la prise en charge de la pathologie et notamment pour l'orientation vers le protocole de chimiothérapie le plus efficace.

Les avantages de l'utilisation de ce modèle sont multiples. Les données de la littérature indiquent que les tumeurs constituées chez la Souris à partir de tissus tumoraux de patients récapitulent à l'identique les caractéristiques de la tumeur initiale (composantes cellulaires, vascularisation, métastases...). Nous pourrions donc traiter ces tumeurs par chimiothérapie et ainsi mimer la chimiorésistance telle qu'elle est acquise chez le patient en tant qu'organisme complexe. De la même manière, les dommages escomptés lors du traitement des souris par chimiothérapie sont similaires aux effets des traitements chez les patients. L'état général des souris sera quotidiennement vérifié. Tout signe de douleur liée à la greffe ou aux effets secondaires de la chimiothérapie entraînera, le cas échéant, le sacrifice prématuré ou l'arrêt momentané du traitement.

Nombre d'animaux prévus : 420 Souris immunodéprimées (Nude BALB/cAnNRj-Foxn1nu)

Le nombre d'animaux par groupe (21 souris par prélèvement biopsique de patient et par lignée cellulaire) est prévu pour avoir un effectif suffisant permettant une analyse statistique significative et est justifié par la règle des 3R :

Remplacement : Il s'agit de l'étude d'un modèle de résistance à la chimiothérapie dont la complexité et la cinétique ne peuvent être reproduites in vitro. Cette étude est basée sur des résultats très prometteurs obtenus in vitro via des modèles cellulaires.

Réduction : Le nombre d'échantillons nécessaires à ces études a été calculé pour atteindre un effectif suffisant pour obtenir des conclusions statistiquement significatives. En effet, selon la Méthode de Gehan, nous estimons à 13 le nombre de patients nécessaires afin d'être assurés de mettre en évidence un nombre statistiquement suffisant d'événements de chimiorésistance au cours de cette étude. Les chances de réussite de la xénogreffe étant évaluées à 80%, un minimum de 17 patients sera inclus.

Raffinement : Pour réduire l'angoisse des animaux une acclimatation de 7 jours est prévue pendant 7 jours avant le début des expériences. Les souris portant des tumeurs, présentant des signes de douleur seront euthanasiées. Des points limites sont définis (taille de la tumeur, nécrose/ ulcération de la tumeur, perte de poids >20%) et seront appliqués pour éviter toute souffrance de l'animal.

Les doses de chimiothérapie correspondent à des doses ayant une activité thérapeutique prouvée dans la littérature. De plus, l'ensemble des organes d'intérêt (tumeurs et sites métastatiques tels que le foie et les poumons) seront prélevés sur un même animal après euthanasie des animaux.

12093 Le recours à l'utilisation de l'animal de laboratoire à des fins scientifiques ouvre toujours des discussions et fait débat. La transposition de la Directive Européenne de 2010 a permis la publication des textes de référence en droit Français en 2013.

Un accent a été porté dans cette nouvelle réglementation sur les aspects éthiques en expérimentation, sur la stricte application des principes de réduction, de remplacement et de

raffinement. La révision éthique des projets est rendue obligatoire et l'autorisation de mise en œuvre des projets est apparue.

Ces démarches vont dans le sens de la légitimation de l'expérimentation et pour satisfaire à une demande de transparence vis-à-vis des acteurs publics.

Pour produire une recherche de qualité qui soit faite dans les règles de l'art et dans l'esprit de la Directive, la notion de compétence a remplacé celle d'habilitation jusqu'alors employée. La formation des personnels, ainsi que le suivi de l'acquisition et du maintien des compétences a fait l'objet d'un arrêté spécifique pour en fixer le cadre.

Ce projet ne consiste donc pas à utiliser des animaux pour répondre à une problématique scientifique posée mais à déterminer un contexte précis pour autoriser leur utilisation dans un but de formation et d'enseignement.

La réussite de l'expérimentation ne peut être atteinte que par l'excellence de la réalisation des actes pratiqués, cela contribue à terme à la réalisation de travaux de qualité, sans utilisation d'animaux en surnombre et dans le respect de l'animal.

Au cours de nos diverses procédures expérimentales sur rats et souris, nous pratiquons des gestes en vue d'identifier les animaux, de leur administrer des substances ou réaliser des prélèvements.

Ce programme de formation établi pour le perfectionnement et l'apprentissage de méthodologies sera exclusivement destiné aux expérimentateurs de l'établissement utilisateur pour lequel il aura été autorisé.

Le principe de raffinement sera appliqué au cours de la réalisation des gestes expérimentaux (recours aux moyens anesthésiques locaux : lidocaïne par exemple lors des injections). Au cours de la vie au laboratoire des animaux, nous veillerons par l'utilisation d'accessoires d'enrichissement à fournir aux animaux une amélioration de leur bien-être et de conditions d'hébergement. Les méthodes qui seront enseignées ne feront appel qu'à un nombre restreint d'animaux satisfaisant ainsi le principe de réduction.

Le responsable du suivi des formations, du maintien et de l'acquisition des compétences aura la charge de veiller aux conditions de dispense des enseignements au sein de l'établissement utilisateur.

Au cours de la durée maximale du projet (5ans), nous pourrons utiliser 700 animaux (350 souris et 350 rats).

12094 Les rongeurs, principalement la souris et le rat, jouent un rôle prépondérant en recherche biomédicale dans les études in vivo de validation des composés à visée thérapeutique. En effet, la présence de gènes équivalents chez l'homme et le rongeur, et la facilité actuelle de modification de son génome rendent le rongeur indispensable dans les études de recherche moléculaire, pharmacologique et toxicologique.

Néanmoins, l'évaluation des modifications physiologiques, phénotypiques lors des tests de nouvelles thérapies explorées dans les modèles pathologiques rongeurs restait difficile et imparfaite. L'analyse longitudinale (répétition des mesures dans le temps chez le même animal) présente plusieurs avantages : mieux gérer et anticiper les effets méconnus des nouvelles thérapies ; améliorer l'aspect éthique en diminuant le nombre d'animaux et en utilisant une technologie non invasive ; proposer des approches d'évaluation translationnelles (applicable en clinique).

Les appareils d'imagerie utilisés en routine clinique (échographie, scanner à rayons-X, imagerie nucléaire, imagerie par résonance magnétique et imagerie optique) ont été adaptés pour l'utilisation chez le rongeur. Ils permettent, sous anesthésie, de réaliser des analyses longitudinales des modifications phénotypiques d'une pathologie et des effets d'un traitement sur le plan anatomique, fonctionnel et moléculaire.

Aucune méthode substitutive fiable n'existant aujourd'hui, le recours à l'animal est la dernière étape avant les tests cliniques pour valider une thérapie ayant démontrée des propriétés d'intérêt in vitro. Il est en effet primordial d'évaluer dans un organisme complexe vivant le devenir (pharmacocinétique) et les effets (pharmacodynamie, tolérance efficacité) du médicament.

Les conditions d'utilisation des animaux sont encadrées par des recommandations techniques et éthiques internes émanant des Directives Européennes en vigueur afin de préserver le bien-être de l'animal et en réduisant au maximum tout stress. Les sessions d'imagerie s'effectuent sous anesthésie générale pour garder l'animal immobile sans stress. Selon le cas et si nécessaire, d'autres examens complémentaires peuvent être réalisés sous anesthésie locale ou générale. Un suivi quotidien des animaux est effectué par le personnel de l'animalerie selon une liste de critères d'alarme et d'arrêt d'étude. Le responsable de l'étude est informé de toute anomalie. L'observation est réalisée par le personnel intervenant dans l'étude et qui consigne toutes les observations liées au suivi du bien-être des animaux.

Le nombre d'animaux utilisé est préalablement basé sur les publications scientifiques. Ensuite, sur la base des données historiques expérimentales, un biostatisticien est consulté pour optimiser le nombre d'animaux à utiliser en fonction de l'objectif et du design (nombre de groupes d'animaux, type de comparaisons et répétitions) de l'étude, du nombre et de la variabilité des paramètres mesurés et de l'importance des effets à mettre en évidence. Ce projet couvre l'utilisation d'un maximum 11 000 animaux (10000 souris et 1000 rats) sur 5 ans.

12095 La différenciation des organes sexuels chez les mammifères se caractérise par un ensemble d'étapes clés au cours desquelles se construit le futur ovaire ou le futur testicule et se détermine la quantité et la qualité du stock de gamètes (ovule ou spermatozoïde), paramètre clé de la fertilité à l'âge adulte. Différents processus, encore partiellement compris, se mettent en place au cours du développement de ces organes sexuels. Un dysfonctionnement intervenant au cours de ce développement peut conduire à des stérilités aussi bien féminines que masculines. Au laboratoire, nos travaux de recherche visent à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des organes sexuels des deux sexes et à utiliser ces connaissances pour développer des applications agronomiques et biomédicales.

Des mutations génétiques sont soupçonnées d'être responsables dans l'espèce humaine de certains cas d'azoospermie (absence totale de spermatozoïde dans le sperme), conduisant à l'infertilité des patients affectés. Afin de démontrer le rôle précis des gènes impliqués, dans la formation des futurs gamètes, l'utilisation d'un modèle animal est indispensable. L'espèce murine est la plus indiquée pour des études de génomique fonctionnelle. Aussi, pour ces recherches, nous disposons et entretenons différentes lignées de souris génétiquement modifiées ne présentant aucun caractère dommageable, mais uniquement des défauts de reproduction. Les gènes étudiés sont exprimés exclusivement dans les organes sexuels de ces animaux, certains sont même présents uniquement dans le testicule et contribuent à la production de spermatozoïdes fertiles.

La spermatogenèse est le processus par lequel les futures cellules sexuelles se différencient pour former les spermatozoïdes. Elle se déroule à l'intérieur de tubes (les tubes séminifères) dans le testicule ; débute juste avant la puberté (à partir de 5 jours dans le testicule murin) et se déroule par vagues successives (de façon continue mais asynchrone) dans ces tubes séminifères. Ces vagues de spermatogénèse asynchrones révèlent 12 états de différenciation des tubes séminifères du testicule. L'acide rétinoïque, le métabolite actif de la vitamine A, est nécessaire au sein du testicule pour déclencher la première étape de différenciation des cellules sexuelles mâles. Afin de mieux comprendre les différentes étapes conduisant à la production des spermatozoïdes fertiles, nous souhaitons synchroniser la première vague de spermatogenèse pour s'affranchir d'un état hétérogène de ces cellules sexuelles. La synchronisation des vagues permet d'obtenir beaucoup plus de cellules sexuelles à un même stade de différenciation, réduisant ainsi le nombre d'animaux nécessaires pour nos analyses.

Pour ce faire, une injection unique sous-cutanée d'acide rétinoïque sera réalisée juste avant le début de la spermatogenèse chez des souriceaux mâles (âgés de 3 jours) dont certains issus de différentes lignées murines. Cette administration permet de se libérer des vagues de spermatogenèse des tubes séminifères et donc de les synchroniser.

Ces animaux permettront de fournir les échantillons biologiques nécessaires à nos expérimentations: 5 paires de testicules à 6 stades de développement (âge des souris: 10, 15, 17, 20, 28 et 42 jours, pour 4 lignées de souris différentes soit 120 souriceaux nécessaires). Pour

obtenir 5 souris mâles du génotype d'intérêt par lot, notre projet nécessite au total l'utilisation de 300 souris. Ce nombre, qui prend en compte les exigences réglementaires est incompressible car seules les souris nous permettront de réaliser cette expérimentation. Le respect du principe des "3Rs" est inclus dans les points suivants:

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés sera donc réduit au minimum. Synchroniser la spermatogenèse permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires car cette synchronisation va amplifier le nombre de cellules dans un même état de différenciation.

Raffinement impliquant la notion de points limites: les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée afin de détecter toute manifestation de souffrance. Des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire après discussion avec le personnel de l'animalerie et le vétérinaire référent. Enfin, le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux dans leur milieu.

Remplacement: Dans ce projet, il est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Les mécanismes étudiés mettent en jeu des interactions cellulaires complexes dans l'unité fonctionnelle du testicule, les tubes séminifères, qu'il est impossible, pour le moment, de reproduire dans un modèle cellulaire.

Ce projet devrait nous renseigner sur le rôle fonctionnel de certains gènes au cours d'étapes clés de la spermatogenèse et nous permettre de déterminer les partenaires ou cibles de ces gènes dont des nouveaux gènes impliqués dans la fertilité chez les mammifères, notamment au cours de la spermatogenèse.

12096 En France, la formation des médecins - et plus particulièrement des chirurgiens - repose en grande partie sur le compagnonnage au chevet du patient avec le système de l'internat. Toutefois, en termes de sécurité du patient, certains gestes gagnent à être pratiqués par les jeunes praticiens sur des modèles inertes (simulateurs, cadavres, ...) mais aussi sur des modèles animaux qui demeurent irremplaçables pour se familiariser avec le stress, les événements inattendus ou indésirables rencontrés au bloc opératoire. Le décret 2011-2116 a introduit l'obligation de formation continue pour les médecins en exercice et, pour les mêmes raisons, le recours à l'animal vivant demeure irremplaçable dans de nombreux cas.

Le présent projet concerne la partie pratique sur des animaux permettant d'enseigner à des chirurgiens reconnus comme spécialistes par l'ordre des médecins, des internes en chirurgie ou des vétérinaires en cours de formation chirurgicale. La partie pratique consiste à pratiquer sur des rats les techniques d'anesthésie et d'analgésie actuelles et à apprendre à réaliser des anastomoses de plusieurs vaisseaux sanguins, des transplantations d'organes (reins) et des opérations portant sur des lambeaux cutanés vascularisés. Ces procédures peuvent en partie être simulées sur des modèles inertes. En revanche pour atteindre un niveau de compétence permettant de les réaliser sur des patients humains ou des animaux, le recours à l'animal vivant demeure indispensable (étanchéité des sutures, complexité des parois vasculaires, réactions neurovégétatives ne sont pas à ce jour reproduites par les modèles synthétiques).

La formation visera des groupes constitués au maximum de 20 stagiaires et durera 6,5 jours. Afin de réduire l'impact sur l'animal et réduire le nombre d'animaux, toutes les procédures seront classées sans réveil et chaque stagiaire utilisera un animal par demi-journée soit 13 animaux. Nous envisageons de réaliser cette formation à un rythme annuel et le projet utilisera donc au maximum 1300 animaux au total sur 5 ans. Avant leur utilisation à des fins pédagogiques, les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans un environnement enrichi par divers objets attractifs pour cette espèce. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie chirurgicale avec administration d'un analgésique de niveau 3 au cours de l'induction.

12097 Le projet de l'équipe est de comprendre les mécanismes physiologiques et cellulaires des déficiences intellectuelles associées à des changements du nombre de copie (de gènes associés à des déficiences intellectuelles).

Dans ce projet, nous nous intéressons à la perte de fonction d'un gène qui entraîne un syndrome de retard mental associé à une diminution de la taille du cerveau, de l'épilepsie et des comportements autistiques.

Les souris mutées pour ce gène présentent une microcéphalie, une sensibilité aux crises épileptiques induites et un déficit de sociabilité, récapitulant certains des traits observés chez les personnes atteintes du syndrome.

Dans une première demande, nous avons réalisé une série de tests comportementaux portant sur les déficits observés dans le syndrome qui ont permis de mettre en évidence des déficits de mémoire ainsi qu'un déficit d'interaction sociale. De plus, un test permettant d'estimer les capacités de filtrage de l'information sensorielle et consistant en une série de stimuli auditifs a mis en évidence un déficit de réponse des souris au réflexe de sursaut suggérant un déficit auditif chez ces souris.

Afin de vérifier si les souris mutées ont un déficit auditif, nous voulons mesurer les capacités auditives des souris dans un test de réponse auditive du tronc cérébral. Nous utiliserons aussi le test de peur conditionnée qui permet d'évaluer la mémoire associative émotionnelle qui implique entre autre le traitement des informations sensorielles dont le son. Le syndrome étant associé à des épilepsies, nous regarderons si les souris présentent de l'épilepsie de manière spontanée en réalisant un enregistrement électroencéphalographique (EEG) couplé à la vidéo.

Remplacement : Nous utilisons la souris en tant que modèle de ces syndromes comme espèce pouvant être manipulée génétiquement et ainsi modéliser ces pathologies. De plus, les anomalies à observer nécessitent un modèle vivant suffisamment proche de l'homme pour avoir des tests qui peuvent être transposés à celui-ci. Le modèle souris est donc la meilleure option ici.

Raffinement : Après la chirurgie, l'animal sera mis dans une cage placée sur plaque chauffante à 37-38°C et sera surveillé jusqu'au réveil complet pour gérer toute éventuelle complication. En cas de douleur observée en post-opératoire, une injection d'analgésique sera administrée en sous-cutané. La reproduction et l'élevage de nos animaux se font dans un environnement contrôlé permettant une réduction du stress pour l'animal. Les animaux présentant des signes de douleur seront exclus des analyses et soignés ou euthanasiés selon leur état.

Réduction : Le nombre maximum d'animaux utilisé dans ce projet est estimé à 30 (15 contrôle et 15 mutés). 15 animaux par groupe sont en effet nécessaires pour avoir une puissance statistique suffisante permettant de déterminer si une différence existe entre les deux groupes. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, ces tests seront réalisés de manière séquentielle, avec au minimum une semaine d'intervalle entre chaque test et commenceront vers l'âge de 12 semaines

12098 Le turbot fait partie des quelques espèces pionnières de l'aquaculture marine dont les essais d'élevage larvaire ont commencé en France dans les années 70. Depuis le début des années 90, l'élevage de cette espèce s'est développé et, aujourd'hui, cette source d'approvisionnement dépasse celle de la pêche. Il faut trois ans pour obtenir un turbot d'élevage de 1,2 kg. En Europe, l'Espagne est le principal producteur (66 % de la production européenne). La France (production de 350 t / an, dont les 3/4 en label Rouge) est par ailleurs le leader mondial pour la production de jeunes turbots exportés pour l'élevage vers l'Europe ou la Chine.

Les pathologies infectieuses sont une menace pour le développement durable de l'aquaculture et l'edwardsiellose, causée par la bactérie à Gram négatif *Edwardsiella tarda*, est une des principales pathologies infectieuses fréquemment retrouvées dans la filière Turbot. Lorsque la maladie survient en élevage, une antibiothérapie est possible mais avec un risque de rechute important. Par ailleurs, si certains vaccins existent, ils présentent des efficacités limitées.

Les objectifs de ce projet sont :

- 1) de mettre en place une procédure d'infection expérimentale par *Edwardsiella tarda* chez le Turbot (*Scophthalmus maximus*) afin de reproduire la maladie en conditions contrôlées (procédure expérimentale n°1) ;
- 2) d'appliquer cette procédure à des populations commerciales de juvéniles pour pouvoir appréhender les relations génétiques entre la résistance à la bactérie et les traditionnels caractères

de croissance et de qualité et proposer des index de sélection génétique utilisables par les professionnels (procédure expérimentale n°2).

Un total de 4500 turbotins sera utilisé pour réaliser les deux procédures expérimentales prévues. La procédure sera menée dans le respect de la règle des 3R, à savoir tout d'abord la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique et le raffinement des conditions d'hébergement. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux (volume adapté d'eau de mer filtrée et traitée aux UV, avec renouvellement en continu, oxygénation suffisante, rythme jour/nuit naturel, présence d'un nombre suffisant de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche, bassins adaptés avec surface au sol suffisante). Le remplacement n'est pas envisageable ; l'utilisation du Turbot étant nécessaire puisqu'il s'agit de l'espèce d'élevage chez laquelle *Edwardsiella tarda* est un pathogène majeur.

12099 A la suite d'une atteinte traumatique ou pathologique de la moelle épinière, les sujets subissent d'importantes détériorations bien connues et identifiées du système sensori-moteur (paralysie, insensibilité), mais également des modifications de l'activité du système nerveux autonome. Ces dysfonctionnements cardiovasculaires contribuent à 40% des décès chez les patients blessés médullaires. La pression artérielle est régulée par des neurones sympathiques situés dans la moelle épinière. Le niveau d'activité de ces neurones au repos constitue un des paramètres centraux du contrôle à long terme de la pression sanguine. Classiquement, on considérait que la régulation de la pression artérielle était sous le contrôle exclusif de voies descendantes en provenance du tronc cérébral qui régulaient l'activité des neurones sympathiques spinaux. Nous avons récemment montré que l'activité des neurones sympathiques pouvait aussi être contrôlée directement à l'étage spinal par un circuit intraspinal rythmogène, activé par le système cholinergique.

Dans ce projet, nous postulons que l'existence d'un tel mécanisme de couplage intraspinal et la possibilité d'activer conjointement les systèmes sympathique et somatique à l'aide de traitements pharmacologiques génère des perspectives de traitements afin de réduire la gravité des symptômes vasculaires chez les patients atteints de lésions spinales. Ce projet a ainsi pour objectif d'identifier dans un modèle pré-clinique les effets d'une lésion médullaire sur la régulation de l'homéostasie du système nerveux végétatif.

Le choix de la mise en place du projet est le fruit d'un travail préparatoire qui a consisté à réunir l'ensemble des moyens matériels (chirurgicaux, tests comportementaux etc.) et l'expertise nécessaire à sa réalisation. Au regard de l'absence d'outils non invasifs permettant chez l'homme l'exploration des phénomènes physiologiques que nous souhaitons étudier, et du manque de connaissances nécessaires à l'établissement d'outils de modélisation des réseaux de neurones sympathiques, notre projet ne peut s'abstenir de l'utilisation du modèle animal.

L'étude comprendra deux groupes d'animaux : témoins et lésés médullaires, chaque groupe comprenant 20 animaux, chiffre qui prend en compte les contraintes statistiques et la nature des expériences/analyses réalisées. Chaque expérience sera lancée dans un premier temps sur un nombre restreint d'animaux afin d'évaluer la pertinence de poursuivre la série expérimentale. Nous utiliserons au maximum 60 animaux comprenant les animaux des différents groupes et des animaux utilisés dans les expériences préliminaires (20 max.) afin de vérifier l'efficacité des procédures et de raffiner les protocoles.

Nous serons particulièrement vigilants à ce qui a trait au bien-être animal et la prise en charge de la douleur. Des points limites spécifiques de notre étude ainsi que des procédures adaptées ont été établies (notamment prophylactiques et analgésiques) qui permettront de garantir la pertinence des résultats et le bien-être des animaux. Les chercheurs participant au projet ont une solide expérience dans la manipulation de rongeurs et l'ensemble des compétences requises à sa réalisation (notamment chirurgicales). À ce titre, il convient de préciser que le projet est bâti en accord avec les recommandations et conseils de la vétérinaire de l'établissement. Cette dernière sera sollicitée chaque fois que nécessaire par les coordinateurs du projet qui lui permettront en outre de suivre,

bien que de façon externe, le déroulement du projet et de proposer des procédures de raffinement bénéfiques à tous les égards.

12100 Les perineuronal nets (PNNs) constituent une matrice extracellulaire qui entourent les neurones et contribuent à la plasticité des contacts entre neurones voisins. On les trouve dans plusieurs régions cérébrales comme le cortex, l'amygdale, l'hippocampe mais leur fonction précise reste mal connue. Le but de ce protocole est d'explorer leur impact dans la vulnérabilité aux effets du stress, en fonction de l'âge des souris (adolescentes ou adultes) et de la région du cerveau (amygdale ou cortex préfrontal).

Pour cette expérimentation 120 souris maximum seront utilisées.

Concernant l'application de la règle des 3 R dans notre étude:

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. L'étude des effets du stress repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les analyses tissulaires nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=15 sujets par groupe expérimental). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes). Les animaux recevront un traitement analgésique avant, juste après et 24-48 suivant l'intervention, puis si nécessaire un traitement antibiotique. Chaque animal est placé sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire

12101 Environ 25% du volume cérébral est occupé par l'espace extracellulaire (ECS) qui sert de microenvironnement pour le cerveau et forme un canal de communication chimique intercellulaire. Il a été montré que la structure et la diffusion de l'ECS sont très hétérogènes et qu'elles dépendent de conditions internes et externes, telles que le système de sommeil/éveil. De plus, l'ECS fournit un réservoir pour les ions impliqués dans l'activité électrique des neurones et semble jouer un rôle clé dans la transmission de substances neuro-actives entre les cellules. Ainsi, l'ECS n'est pas seulement le siège de toutes sortes d'interactions cellule-cellule, mais peut également jouer un rôle important dans des fonctions neuronales cruciales, telles que la mémorisation ou la formation de circuits neuronaux.

Toutefois, durant les dernières décennies, l'ECS a très peu été étudié principalement à cause de la difficulté à l'observer. En effet, la seule technique capable de le visualiser était la microscopie électronique qui, du fait de la fixation chimique et de la déshydratation des tissus, réduit presque intégralement le volume de l'ECS. Si les techniques récentes de cryofixation permettent de préserver localement l'ECS dans certaines régions du cerveau, elles ne permettent pas d'étudier les changements dynamiques de l'ECS dans les tissus vivants.

Afin de visualiser la nanostructure de l'ECS, une nouvelle approche d'imagerie a été mise en place, à savoir la technique de Shadow imaging (SUSHI). Dans cette approche, un fluorophore est injecté dans le cerveau afin de visualiser l'ECS. En outre, comme le fluorophore ne pénètre pas les cellules, celles-ci apparaissent sous forme d'empreintes négatives, ce qui permet d'imager également la structure anatomique des cellules non marquées. Cette méthode présente de grands avantages puisqu'elle n'est pas sensible au photo-blanchiment (la diffusion du fluorophore permet de maintenir un signal constant) ni à la photo-toxicité (puisque le fluorophore reste en dehors des cellules). Dans le but de faire, de l'imagerie chronique pour suivre l'évolution de l'ECS sur plusieurs jours, il apparaît nécessaire d'optimiser la méthode d'injection du fluorophore. Pour ce faire, nous proposons de démontrer deux approches d'injection de fluorophores dans le fluide cérébro-spinal chez la souris.

Le projet de cette formation est ainsi de montrer les nouvelles techniques d'imagerie in vivo qui permettent d'observer et d'étudier la dynamique des échanges neuronaux en condition physiologique sur l'animal vivant et de pouvoir suivre l'interaction des neurones avec l'ECS sur plusieurs jours consécutifs. Les animaux de ce projet subiront une chirurgie suivie 4 semaines après, de sessions d'imagerie tous les 2 jours pendant une dizaine de jours.

Ce projet sera réalisé sur 125 souris au total.

Dans ce projet nous respecterons les 3R:

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

ii) Raffinement : les méthodologies utilisées dans ce projet impliquent la mise en œuvre de toutes les stratégies expérimentales et pharmacologiques disponibles actuellement pour réduire le nombre d'animaux utilisés mais aussi minimiser les possibles effets délétères pour ceux-ci. Ainsi, nos mesures mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales impliquent une induction et suivi de l'anesthésie, une mise en place d'analgésie en pré et post-opération, une installation tout au long des procédures chirurgicales de contrôle de la température par tapis chauffant, avec un respect particulier de la notion de points limites adaptés à chaque procédure (critères d'interruption en cas de souffrance des animaux).

(iii) Remplacement : le lien entre la transmission neuronale et l'interaction avec l'ECS, ne peut être étudié avec des modèles in vitro de neurones en culture, nous ne pouvons donc pas remplacer ce modèle animal.

Ce projet a pour but de former des étudiants afin qu'ils soient en mesure de réaliser au mieux les procédures qu'ils auront apprises et transmettre ainsi ces techniques dans leur laboratoire d'origine. Une meilleure connaissance de nouvelles techniques de chirurgie et d'imagerie leur permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés lorsqu'ils

voudront réaliser ces techniques pour leurs besoins de recherche.

12102 La principale fonction du rein est la filtration du sang et la formation de l'urine. Le rein est notamment composé de glomérules, principaux acteurs de la filtration. Sa composition cellulaire est en rapport avec sa fonction : en autres des cellules endothéliales du capillaire sanguin et des cellules spécialisées dans la filtration, les podocytes. De plus, une capsule composée de cellules épithéliales pariétales glomérulaires (se trouvant dans un état quiescent) permettant de contenir l'urine primitive.

Les mécanismes attendant aux néphropathies sont variés et notre laboratoire a porté son attention sur la glomérulonéphrite extracapillaire (GEC). Elle se manifeste par une dégradation rapide de la fonction rénale et se caractérise par une prolifération pathologique des cellules épithéliales pariétales glomérulaires (PEC), formant le croissant extracapillaire qui aboutit à l'obstruction et la dysfonction du glomérule. Nous avons souhaité étudier les voies de stress impliquées dans la formation du croissant incluant des protéines particulières, les Heat Shock Protein (HSP) et notamment HSP27.

Les premiers résultats suggèrent un rôle délétère de cette protéine. En effet, faiblement détectée dans le glomérule à l'état basal, HSP27 est surexprimée dans les croissants extracapillaires, principalement dans les PEC et ce à un stade précoce (précédent la formation de croissant). De plus, HSP27 est sécrétée, et les premières données suggèrent une augmentation des taux sériques au cours des GEC en poussée. Enfin des données in vitro ont montré une corrélation entre expression d'HSP27 et activation des PEC.

Ainsi, l'objectif suivant est la caractérisation du rôle des HSP in vivo dans un modèle murin de GEC. Nous préciserons dans ce modèle l'évolution de l'expression rénale d'HSP27 et de sa forme circulante dans le temps. Nous chercherons par ailleurs, à évaluer l'impact de l'inhibition de cette protéine sur le développement de la GEC par un modèle KO et par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique (oligonucléotide anti-sens) avec comme objectif d'en déterminer le potentiel rôle thérapeutique.

En effet, après des expériences in vitro qui nous ont permis d'établir le lien entre HSP27 et activation des PEC, les modèles animaux sont nécessaires pour tester la pertinence physiopathologique de ces données et tester l'inhibition pharmacologique dans un organisme intégré. Les groupes de souris nécessaires à notre étude in vivo ont été établis en prenant en compte la variabilité interindividuelle ainsi que la variabilité selon les fonds génétiques utilisés dans nos expériences. Le nombre de souris envisagé (170 souris) a été déterminé au plus juste suite à une étude statistique pour les différents groupes des 3 expériences décrites ci-dessous. Au cours de ce projet, nous veillerons à préserver le bien-être de l'animal en utilisant toutes les méthodes de sédation disponibles pour les gestes pouvant provoquer une douleur. De plus, les animaux seront surveillés pour ne pas leur infliger de souffrance inutile. Les souris seront hébergées 5 par cage avec un enrichissement du milieu et une surveillance rapprochée. Nous nous rapprocherons du comité de bien-être animal présent dans l'établissement au moindre doute d'inconfort, douleur ou souffrance de l'animal.

12103 L'être humain passe environ un tiers de sa vie à dormir. Pendant le sommeil, le cerveau traite les informations, consolide les souvenirs et effectue un certain nombre de processus de maintenance qui permettent son bon fonctionnement lors de l'éveil. Cependant, il est encore inconnu si le sommeil et l'éveil modulent directement la formation et l'élimination des synapses, les structures de communications entre les neurones, observées lors de l'apprentissage. Les microglies, cellules immunitaires résidentes du système nerveux central, sont maintenant reconnues comme des contributeurs essentiels à plusieurs processus cognitifs incluant l'apprentissage et la mémoire. Pendant le sommeil et l'éveil, plusieurs molécules inflammatoires, pouvant influencer la fonction des microglies, varient de façon systémique. L'environnement inflammatoire durant le sommeil suggère que le sommeil et l'éveil pourraient influencer différemment les fonctions microgliales. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que le sommeil et l'éveil régulent différemment les interactions entre les microglies et les synapses. Pour tester cette hypothèse, nous exposerons de jeunes souris adultes à un cycle de sommeil-éveil normal ou les priverons de sommeil. Un second groupe de souris sera dépleté en microglies à l'aide d'une drogue dédiée. Nous enregistrerons l'activité veille/sommeil par électroencéphalographie (EEG) couplée à de l'électromyographie (EMG) et nous quantifierons le temps passé dans les différentes phases de sommeil et d'éveil ainsi que la qualité du sommeil (analyse de l'amplitude des oscillations corticales). Nous évaluerons ensuite les capacités d'apprentissage et de mémoire des différents groupes de souris.

Ainsi, ce projet permettra de déterminer l'implication des microglies dans la régulation des fonctions cognitives du sommeil, particulièrement en ce qui a trait à la mémoire et l'apprentissage. Cela pourrait également aider à élucider leurs rôles dans les troubles du sommeil.

Nombre d'animaux utilisés : 350

Pour toutes les procédures expérimentales, nous avons calculé le nombre minimal de souris requis afin d'aboutir à des données analysables par méthodes statistiques classiques. Nous ne pouvons remplacer les animaux par d'autres techniques. Nous prenons enfin en compte le bien-être des animaux via l'enrichissement des cages, la stabulation en cages collectives, la prise en charge de la douleur si nécessaire et l'euthanasie des animaux si les points limites sont dépassés (cf détails dans la suite de la demande).

Règle des 3Rs :

« Remplacer » : L'étude des régimes alimentaires nécessite l'utilisation d'animaux vivants. De même, les comportements ne peuvent être étudiés que sur des animaux vivants et vigiles.

L'objectif général du projet vise à étudier la possibilité d'un rôle microgliale dans l'homéostasie du sommeil chez la souris. Pour se faire, nous utilisons des tests in vivo, et dans ce contexte, le recours à des modèles animaux pertinents et adaptés aux études in vivo reste donc une nécessité expérimentale afin d'appréhender la réalité physiologique de nos résultats. Une recherche d'alternatives et d'autres méthodes dans des bases de données démontre que les solutions de rechange appropriées à ces procédures ne sont pas disponibles, et qu'aucun duplicata du travail proposé n'est aujourd'hui identifié.

«Réduire» : Nous avons choisi d'utiliser 12 animaux par condition expérimentale avec les contrôles appropriés comme cela est classiquement réalisé. Cela nous permettrait d'avoir des données analysables par méthodes statistiques classiques.

«Raffiner» : Les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures, soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupe sociaux le plus longtemps possible. Ils auront à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après les différentes expérimentations (pesée, vérification de l'état du pelage, des yeux, de la capacité à s'alimenter, de la vivacité et du comportement de l'animal. Suites à ces signes nous mettons en place des mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire). Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

12104 Parmi les maladies neurodégénératives, la sclérose en plaques (SEP) est la maladie neurologique invalidante la plus courante des jeunes adultes, touchant 2,3 millions personnes dans le monde entier et conduisant dans la plupart des cas à une incapacité clinique irréversible. Malgré l'augmentation du nombre et de l'efficacité de nouvelles options thérapeutiques, les traitements curatifs pour les patients atteints de SEP font défaut.

Cette maladie neuro-inflammatoire est caractérisée par une démyélinisation neuronale entraînant des dommages axonaux, aboutissant au développement de plaques sclérosées multifocales. Dans la SEP, l'activation de la microglie semble jouer un double rôle, tous deux favorisant l'inflammation chronique et la neuro-dégénérescence par la modulation des cellules immunitaires T et la libération de molécules neurotoxiques.

Les traitements actuels ont une efficacité insuffisante pour lutter contre la progression de la maladie. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet, le but étant d'évaluer l'effet de nouveaux candidats médicaments sur la réponse inflammatoire dans des modèles rongeurs de neuro-inflammation.

Pour caractériser la neuro-inflammation et suivre son évolution dans les modèles rongeurs sélectionnés pour ce projet, nous utilisons la tomographie par émission de positons (TEP). C'est une technique d'imagerie parfaitement adaptée à la taille du rongeur qui permet le suivi longitudinal du développement d'un état pathologique et de son traitement. L'utilisation de cet outil offre l'opportunité, d'une part, de mieux appréhender les pathologies d'un point de vue métabolique, et d'autre part de suivre les réponses à un traitement pharmaceutique.

Dans ce projet, trois modèles de neuro-inflammation sont proposés ; Le choix de ces modèles repose sur une littérature soigneusement choisie en tenant compte des objectifs scientifiques attendus : 1) Des études expérimentales ont montré chez le rongeur que l'administration périphérique de Lipopolysaccharide provoque une réponse immunologique entraînant une activation microgliale représentative du processus neuro-inflammatoire observé chez les malades atteints de SEP. 2) L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est un modèle animal utile de la SEP, car elle se caractérise également par la formation de lésions dans le système nerveux central, par une déficience motrice et par des réactions auto-immunes et inflammatoires. Le modèle EAE est induit avec un peptide dérivé de la protéine de la myéline oligodendrocyte (MOG) 35-55 chez la souris. Les souris EAE développent une forme progressive de la maladie. 3) Un modèle transgénique murin, celui de la maladie de Sandhoff, reproduit les principales caractéristiques des patients atteints de cette pathologie notamment une importante neuro-inflammation. Ces 3 modèles ont été retenus pour ce projet, l'ensemble faisant intervenir un total de 3600 animaux sur 5 ans (1800 souris + 1800 rats). Les expérimentations sont menées sous le

contrôle de personnels expérimentés dans le respect des règles de l'expérimentation animale, en particulier de la règle des 3R. Cette dernière sera considérée de la façon suivante :

Remplacement : Actuellement, l'utilisation d'animaux vivants reste le moyen incontournable de montrer les relations pharmacocinétique-pharmacodynamie, le devenir et la tolérance du composé à visée thérapeutique dans un organisme complexe ; aucune méthode alternative d'évaluation d'une molécule (in vitro ou in silico) ne permet de mimer toutes les interactions.

Réduction : Le caractère longitudinal de la technique d'imagerie TEP diminue de manière très significative le nombre d'animaux ; la répétition des sessions d'imagerie à différents temps au cours de l'étude permet d'obtenir une quantité importante d'informations avec un nombre réduit d'animaux. Un support biostatistiques est apporté par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées et le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : dans le cadre de ce projet, les animaux auront des administrations intrapéritonéales ainsi que des anesthésies répétées pour les sessions d'imagerie. L'évolution de la pathologie et le bien-être des animaux sont suivis sur des critères généraux et spécifiques du modèle. Les expérimentateurs sont formés à l'observation des signes cliniques liés aux modèles de neuroinflammation ; d'autre-part seuls les événements physiopathologiques précoces de la SEP intéressent ce projet et ne nécessitent pas de poursuivre l'étude au-delà de critères définis selon une grille de score clairement défini et basé sur des éléments publiés dans la littérature spécialisée.

12105 Le glioblastome est une tumeur cérébrale actuellement incurable malgré un traitement combinant chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie, ce qui nécessite de trouver urgemment de nouvelles solutions thérapeutiques. Un facteur limitant l'efficacité des traitements existants pour le glioblastome est la présence de cellules tumorales qui ne répondent pas aux agents chimiothérapeutiques (cellules chimiorésistantes). Nous avons démontré au laboratoire l'innocuité et l'internalisation des nanoparticules métalliques (NP), sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses in vitro ainsi que chez la souris. Il a par ailleurs été démontré qu'une stimulation lumineuse (par laser) de ces nanoparticules provoque localement au niveau de la tumeur une élévation de la température induisant un effet antitumoral (thérapie par photothermie). Cette hyperthermie locale peut être monitorée de manière non invasive de façon à induire un traitement antitumoral sans douleur ou effet secondaire chez l'animal.

Dans ce projet, nous souhaiterions évaluer l'efficacité des NP de titane chez l'animal (souris nude) porteur d'une tumeur de glioblastome sous-cutanées. Les NP seront directement administrées dans la tumeur et activées par stimulation photothermique afin de réduire la croissance des tumeurs.

Le projet sera divisé en deux étapes. La première étape sera une étude pilote sur 2 conditions de traitement (12 souris au total). Le but de cette phase sera de collecter des informations sur l'augmentation de température au niveau tumorale et sur l'efficacité de la photothermie par rapport aux souris non traitées. Si la photothermie n'a aucun effet, le projet prendra fin. En cas contraire, on procèdera à la deuxième étape du projet.

Dans cette deuxième étape on aura 4 conditions de traitement (10 souris par groupe): 1) non traités, 2) NP, 3) laser, 4) NP + laser. Le but de cette étape sera l'évaluation de l'effet antitumorale par photothermie par rapport aux trois groupes contrôles.

Au total, un maximum de 52 souris est prévu pour la globalité de l'étude. Dans le respect de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement), le nombre d'animaux prévu est minimum et suffisant dans chaque groupe. Il est basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 80% de chance d'arriver à un résultat statistiquement significatif. Pour le bien-être de l'animal, les souris seront hébergées selon les normes requises avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) et en groupes de 4 ou 5 individus par cage (dans la première et deuxième étape, respectivement ; cages de 365x205x140 cm, 530 cm²) afin d'éviter le stress de l'isolement. Outre l'anesthésie générale durant toutes les procédures expérimentales (injection des cellules tumorales, administration des traitements et irradiation laser), nous prévoyons d'administrer de l'analgésie en pré- et post-opératoire si nécessaire. Après la greffe nous suivrons la progression de la pathologie en mesurant leur poids et la taille de la tumeur minimum 3 fois par semaine depuis son apparition.

Les souris seront observées quotidiennement, en observant tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques de mal-être (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation, ataxie) en nous appuyant sur une grille d'évaluation de la douleur. Lorsque les souris présenteront un volume tumoral $\geq 800 \text{ mm}^3$, une perte de poids supérieure ou égale à 20% du poids maximum de l'animal (masse tumorale déduite) ou si des signes cliniques apparaissent, les animaux seront mis à mort sans délai.

En conclusion, l'objectif de ce projet est, après validation *in vitro*, de vérifier que les Ti-NP induisent une augmentation de la température après irradiation par laser chez la souris. En plus, on veut évaluer l'efficacité anti-cancéreuse de cette photothermie. Cette étape de validation *in vivo* est indispensable avant toute évaluation clinique chez le patient. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale dans ce domaine.

12106 Au sein des myopathies inflammatoires, les myopathies nécrosantes auto-immunes (MNAI) sont définies histologiquement par la présence d'une importante nécrose des fibres musculaires sans infiltrat inflammatoire. La nature auto-immune des myopathies nécrosantes a été suggérée par leur association fréquente à la présence d'auto-anticorps (aAc) anti-Signal Recognition Particle (SRP) ou, plus récemment, d'aAc anti-3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase (HMGCR) et la corrélation de leur titre avec le myolyse. Notre laboratoire vient d'établir un modèle murin de MNAI par injection à des souris C57BL/6 d'IgG purifiées issues de patients porteurs d'aAc anti-HMGCR. Ce transfert induit une myopathie clinique avec diminution de la force musculaire associée à un dépôt d'IgG et de C5b-9 à la surface des fibres musculaires, démontrant le caractère directement pathogène des aAc et suggérant un rôle cytotoxique exclusif du complément. Il convient donc, à présent, (i) de démontrer que le complément est bien le mécanisme effecteur de la cytotoxicité des aAc anti-HMGCR dans un modèle *in vivo* de MNAI déficient en complément et (ii) de tester une approche thérapeutique ciblant le complément.

Les résultats obtenus au cours d'une étude antérieure menée dans le laboratoire sur un autre modèle murin de myosite, nous permettent de mettre en place les procédures expérimentales en respectant le concept des 3R. Remplacement et réduction: L'utilisation d'animaux dans cette étude est indispensable car nous pouvons étudier le rôle des auto-anticorps –en présence ou absence du système du complément. Le nombre d'animaux nécessaires est réduit au minimum en tenant compte de la variabilité des mesures de la force musculaire et de l'évaluation de la locomotion. Une échelle de gravité des symptômes observés a été établie dans un précédent autre modèle de myopathie établie au laboratoire et permet d'établir un point limite dans l'ensemble des expériences. Elle permet également d'évaluer la douleur des animaux et de mettre en place une procédure visant à la limiter. Des expériences menées *in vitro* ont permis de mettre en évidence le rôle des aAc sur les cellules musculaire et autorise à réduire le nombre d'animaux dédiés aux prélèvements de muscles. Raffinement: l'ensemble des expériences sera réalisé dans une animalerie agréée, où les conditions d'hébergement sont contrôlées : température, hygrométrie, cycle jour/nuit, change et nourriture. Les souris seront élevées en communauté dans des cages enrichies avec du papier. L'ensemble des procédures sera réalisé sous anesthésie gazeuse. Tous les animaux seront euthanasiés par dislocation cervicale en fin de procédure. Le nombre d'animaux nécessaire à cette étude est de 120.

12107 Dans le contexte scientifique de l'écologie urbaine, notre objectif est d'étudier l'impact de la pollution électromagnétique et en métaux traces sur les pigeons des villes. L'effet de cette pollution sur la biodiversité est actuellement peu étudié et peut grandement perturber la dispersion et le mouvement ainsi que la physiologie des pigeons urbains. Afin de tester ces hypothèses, nous utiliserons des GPS spécialement conçus pour les pigeons que nous fixerons sur le dos des individus pendant 2 jours consécutifs. Pour chaque individu collecté, nous extrairons de ces GPS, les mouvements effectués par les pigeons. Ces données nous permettront de voir comment ils évitent ou pas les champs électromagnétiques. Ces échantillonnages s'effectueront sur 5 années et nous prévoyons de fixer les GPS sur 150 pigeons (30 par année). Afin d'atteindre nos objectifs scientifiques, les pigeons seront échantillonnés à plusieurs endroits le long d'un gradient de champ

électromagnétique. Puis nous comparerons les mouvements des pigeons aux sources, fréquences et intensités des champs électromagnétiques dans l'habitat de chacun des individus. Ces mesures du champ électromagnétique seront effectuées à l'aide des données de l'Agence Nationale des Fréquences (<http://www.cartoradio.fr/>). Nous poursuivrons par une expérience de "homing". Dans cette expérience, 30 pigeons seront écartés volontairement de leur habitat. Nous examinerons à l'aide d'un GPS, comment ceux-ci retournent dans leur habitat en fonction des champs électromagnétiques.

Parallèlement, nous mènerons une approche expérimentale où nous exposerons les pigeons à deux métaux traces (zinc et plomb) et comparerons l'effet de cette exposition sur le microbiote intestinal et sur différentes variables physiologiques à ceux d'un groupe témoin (non exposé). Le nombre d'animaux qui seront utilisés par an s'élèvera à 60 (soit 300 individus sur 5 ans). Il faut ajouter à cet effectif les poussins nés en captivité pour lesquels nous souhaitons analyser le microbiote. Nous tablons sur 30 poussins par an (150 poussins sur 5 ans). Par ailleurs, la capture, le déplacement et la captivité seront effectués de telle sorte à minimiser le stress des individus. Nous utiliserons les cages de capture avec appâtage à l'aide de nourriture (graine de maïs) car elles permettent de minimiser le stress. Les pigeons seront hébergés dans une volière extérieure construite en grillage galvanisé, divisée en 16 compartiments et couverte en partie par un toit en tôle afin que les oiseaux puissent se protéger des intempéries. Le volume de chaque compartiment sol représente plus de 2 fois la surface recommandée par l'annexe A de la Convention Européenne (3 m² pour 12 individus).

En résumé, notre étude impliquera 180 pigeons adultes pour la partie sur les GPS et 300 individus pour l'expérience sur les métaux trace. Il faut également ajouter les 150 poussins issus de cette dernière expérience. Au total, notre étude impliquera donc 630 individus (480 adultes et 150 poussins). Ces effectifs constituent le nombre minimal pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Afin d'atteindre nos objectifs scientifiques qui se focalisent sur une population de vertébré en conditions naturelles, le recours à des animaux est nécessaire et il n'y a pas moyen de les remplacer.

12108 L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes et d'identifier les structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués au cours de l'apprentissage, de l'expression et de l'extinction de la peur conditionnée chez la souris. L'extinction de la peur conditionnée chez le rongeur est un modèle des thérapies d'exposition chez l'être humain souvent utilisé dans le cadre de pathologies anxieuses telles que le syndrome de stress post traumatique qui se caractérise par la persistance de mémoires traumatiques à la suite du traitement. L'utilisation d'un modèle comportemental chez le rongeur permettant l'étude des structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués dans le maintien des réponses traumatiques de peur nous permettra à terme le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour des pathologies telles que l'anxiété ou le syndrome de stress post-traumatique. Les animaux subissent une chirurgie peu douloureuse. Une fois leur récupération complète, ils sont soumis à un événement désagréable (léger choc électrique non douloureux) qui induit un stress ponctuel. Cet événement est associé à un contexte particulier (la présentation d'un son). Le son est donc associé pour l'animal au choc électrique. Les souris sont ensuite exposées uniquement au son ; leurs réactions sont observées, ainsi que les structures cérébrales activées par ce phénomène de peur conditionnée. Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer: ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'identification des structures cérébrales et des circuits neuronaux impliqués au cours de l'apprentissage de la peur conditionnée nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes in vivo telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne contiennent pas les connexions neuronales qui sont le sujet de nos travaux. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire: le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est donc de 15 souris par groupe, soit un total de 2640 souris pour la réalisation de ce protocole.

Raffiner: afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes seront utilisées:

A leur arrivée, les animaux sont mis en cage par l'animalier qui effectue un premier contrôle de leur état de santé. Les animaux bénéficient d'une période d'acclimatation, dans des cages collectives et bénéficient d'un enrichissement constitué d'un nid végétal. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser. A la suite de cette période d'acclimatation, les animaux sont placés en cages individuelles. Les souris sont habituées à la manipulation ; elles ne sont donc pas stressées en présence de l'homme et lors des manipulations. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale. Un traitement antalgique est systématique ; il est administré avant et trois jours suivant les actes chirurgicaux pour prévenir toute douleur. L'hébergement individuel des animaux est limité au maximum, et leur environnement est enrichi.

Pour limiter les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons défini des critères d'observation qui permettent d'évaluer l'état de santé et le bien-être des souris. Si les points limites que nous avons fixés sont franchis l'expérience est immédiatement interrompue et l'animal concerné est euthanasié. Cette évaluation est réalisée quotidiennement à partir du moment où l'animal est isolé en cage individuelle et rentre dans la phase expérimentale. Ces mesures ont lieu lors de la manipulation journalière des animaux. Les mesures sont consignées dans un cahier d'expérience prévu à cet effet.

12109 Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité mondiale (sauf en Afrique) et de ce fait, la recherche portant sur ces maladies est une priorité pour l'organisation mondiale de la santé. Parmi ces maladies, celles atteignant les valves séparant les oreillettes des ventricules atteignent 10 à 15% des personnes de plus de 75 ans et ce pourcentage augmente avec l'âge et donc l'espérance de vie. Elles ont souvent pour origine une dilatation de l'anneau auquel sont attachés les feuillets de ces valves.

Le rôle vital de ces valves (nommées "mitrale" à gauche et "tricuspide" à droite) est d'empêcher le sang de refluer du ventricule vers les oreillettes au moment de la contraction du coeur. En ce qui concerne le coeur droit, la dilatation de l'anneau se traduit par un défaut d'occlusion de la valve tricuspide nommée insuffisance tricuspide (IT) fonctionnelle à l'origine de nombreuses formes d'insuffisance cardiaque droite. Les conséquences en sont un souffle cardiaque, bruit généré par le flux du sang s'engouffrant dans le point de non fermeture, et, pour les formes les plus graves, un reflux veineux provoquant une pulsativité des veines et des œdèmes dans l'ensemble de l'organisme dont le sang veineux est moins bien évacué.

Les formes écho-cardiographiques sévères de l'IT ont un mauvais pronostic. Le traitement chirurgical consiste le plus souvent en une réparation valvulaire. Cependant, la persistance ou la récurrence d'une IT sévère est assez fréquente. Cela s'explique habituellement par la non prise en compte, lors de la chirurgie, de la dilatation du ventricule droit qui est un des mécanismes à l'origine de l'IT, notamment en ayant un impact sur le diamètre de l'anneau auquel sont rattachés les trois feuillets de la valve tricuspide.

Le travail expérimental du présent projet a pour objet l'évaluation d'un dispositif chirurgical de remodelage inverse du ventricule droit, destiné à traiter cette composante ventriculaire droite de l'IT. Le principe consiste à implanter un fil en gore-tex qui en rapprochant la paroi ventriculaire droite du septum inter-ventriculaire, corrige la dilatation de ce ventricule, et réduit le diamètre de l'anneau supportant la valve. Chez le patient, nous pensons que ce remodelage de l'anatomie cardiaque améliorera le pronostic des formes graves d'IT.

Le travail, effectué sur des porcs, comporte l'étude de la faisabilité de l'implantation in vivo du dispositif, de son efficacité sur le remodelage inverse et enfin de son effet sur l'étanchéité de la valve pendant la contraction cardiaque. Ultérieurement, si la prévention des récurrences est confirmée, d'autres variantes du dispositif pourront permettre le traitement mini-invasif de l'IT. 8 jeunes porcs se verront implanter le dispositif par voie transventriculaire droite et transseptale. L'efficacité du dispositif sera évaluée ex-vivo après création d'une dilatation ventriculaire droite.

Ce genre de dispositif ne peut être implanté sur des patients humains avant que les preuves d'efficacité et d'innocuité n'aient été apportées dans une espèce animale. La procédure pratiquée ici est sans réveil, l'inconfort généré par l'animal sera donc limité à celui de l'anesthésie. Avant leur entrée dans la phase chirurgicale, les animaux seront hébergés selon nos conditions habituelles qui comportent la mise à disposition d'une litière végétale dans laquelle les animaux s'adonnent à leur comportement fouisseur naturel mais aussi un apprivoisement à l'aide de friandises. Le nombre d'animaux est aussi réduit que possible. Nous estimons que deux animaux devraient suffire à la mise au point et à la validation de l'ensemble du protocole expérimental qui ne devrait pas présenter de difficulté technique. L'innocuité et l'efficacité du dispositif seront évaluées sur les 6 derniers porcs.

- 12110** Les dispositifs médicaux sont soumis, comme les médicaments, à une réglementation stricte permettant de garantir leur intérêt thérapeutique et leur innocuité. Les dispositifs médicaux désignent les produits destinés à être implantés chez l'Homme à des fins médicales (prothèse). mais également les produits utilisés au cours de la chirurgie comme ceux visant à réduire/stopper les saignements éventuels liés à l'opération.

Le développement d'un nouvel hémostatique per-opératoire commence par des études de caractérisation, puis de biocompatibilité et de toxicité in vitro, qui permettent d'obtenir les premières données de sécurité sur le produit. Une fois ces étapes validées, il est nécessaire de compléter les données par des études in vivo dans les conditions d'utilisation envisagées chez l'homme. Ces études in vivo, imposées par la réglementation et ses évolutions, concernent à la fois les produits en développement (validation de la performance du nouveau produit par rapport à une référence du marché) et ponctuellement ceux déjà présent sur le marché.

L'objet de ce projet est de réaliser ces tests chez le porc, espèce référence pour ses similitudes anatomiques avec l'homme, et permettant plusieurs répétitions du test chez un même sujet, ce qui réduit le nombre d'animaux nécessaires. Un maximum de 20 animaux sera utilisé durant les 5 ans du projet, tout en permettant un d'échantillonnage suffisant pour répondre aux besoins scientifiques et réglementaires.

Afin d'éviter toute douleur ou inconfort à l'animal, l'ensemble de la procédure est réalisée sous anesthésie générale profonde, avec une analgésie adaptée et sans réveil.

- 12111** Les lamproies sont des vertébrés anciens dont le système immunitaire est peu connu. L'objectif de ce projet est d'inactiver un gène potentiellement impliqué dans le système immunitaire des lamproies. Des œufs de lamproie fluviatile (*Lampetra fluviatilis*) seront modifiés par la technique CRISPR Cas9 afin d'inactiver le gène CDA. Les œufs puis les larves seront ensuite élevées durant 12 mois et des prélèvements d'individus seront réalisés tous les 3 mois afin de tester l'inactivation du gène CDA.

Remplacement : Ce test ne peut pas être réalisé in vitro et la lamproie fluviatile est l'espèce de lamproie qui présente le double avantage d'avoir une taille modeste (environ 30 cm) et une grande fécondité (plusieurs milliers d'œufs), ce qui facilite la réalisation des fécondations in vitro (10 adultes seront nécessaires à la production des œufs pour ce projet).

Réduction : Pour produire les œufs nécessaire à ce projet seulement quelques individus adultes seront nécessaires (n=5 femelles, et n= 5 mâles, soit 50 individus sur 5 ans).

Raffinement : les adultes nécessaire pour produire les œufs seront gardés dans des bacs de 120 litres et seront anesthésiés avant le prélèvement des gamètes lors des fécondations in vitro.

- 12112** Les molécules anticancéreuses utilisées actuellement en chimiothérapie sont efficaces mais les effets secondaires et les phénomènes de résistance développés par les patients démontrent que le besoin de nouvelles thérapeutiques est toujours insatisfait.

L'immunothérapie fait parties de nouvelles stratégies de lutte contre le cancer. Ces traitements reposent sur l'utilisation d'anticorps. Ce projet vise à produire et développer des anticorps thérapeutiques comme candidat médicament. Plus précisément, nous visons à produire des

anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de surfaces spécifiques aux cellules cancéreuses. Nous pouvons diviser ce projet en deux grandes étapes :

1. Production d'anticorps polyclonaux par ascite. Etape du projet pour lequel nous demandons cette autorisation. Nous devons immuniser des animaux pour faire produire des anticorps polyclonaux que nous pourrons ensuite utiliser pour la production d'anticorps monoclonaux.

2. Production d'anticorps monoclonaux spécifiques. Nous devons immuniser des animaux pour faire produire des anticorps monoclonaux en quantité suffisante que nous pourrons ensuite identifier, valider et sélectionner des anticorps dirigés contre des cibles pertinentes pour le développement de nouveaux traitements humains contre le cancer. L'immunisation de ces animaux consiste à masquer des antigènes de surface avec le fluide ascitique récupéré à l'étape 1. Le protocole d'immunisation et de production d'anticorps monoclonaux sont décrits dans une demande de d'autorisation indépendante.

Le projet présenté ici respecte la règle des 3R :

Réduire : La production d'anticorps polyclonaux via le fluide ascitique permet de réduire le nombre de souris nécessaire par rapport à leur isolation via des prélèvements sanguins. 24 souris seront nécessaires à notre projet.

Raffiner : Les conditions d'hébergement des animaux seront optimales afin d'éviter tout stress. De plus, la santé et le poids des animaux seront suivis tous les jours lors de l'exécution des procédures afin d'assurer l'absence de souffrance excessive.

Remplacer : Aucun modèle ne permet à ce jour de produire efficacement in vitro des anticorps polyclonaux.

12113 L'approvisionnement en eau potable à partir de l'eau de surface nécessite des aménagements en rivière permettant le captage d'une partie du débit. Ces aménagements engendrent une rupture de la continuité écologique, qu'il convient de restaurer conformément à l'article L. 214-17 du Code de l'Environnement. La présente étude consiste à suivre l'efficacité d'une passe à poissons construite en rive droite d'un ouvrage situé au niveau d'une rivière tropicale dans la zone Indopacifique. S'agissant d'une passe dite « multi-espèces », elle a pour objectif d'être fonctionnelle pour toutes les espèces aquatiques susceptibles de coloniser la rivière en aval de la prise d'eau. Actuellement il n'existe aucun retour d'expérience de fonctionnement de ce type d'ouvrage dans cette région du monde.

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

Afin d'évaluer l'efficacité de la passe à poissons pour les différentes espèces identifiées, un suivi par marquage-détection sera réalisé à l'aide de PIT tags implantés sur 4 petites espèces cibles considérées dans le cadre de ce suivi à savoir : le poisson plat *Kuhlia rupestris*, le chitte *Agonostomus telfairii*, la loche des sables *Awaous commersoni* et le cabot noir *Eleotris fusca*. Ces espèces dites amphihalines se reproduisent dans l'océan ou la partie aval des rivières puis remontent les cours d'eau, cette migration étant une contrainte vitale pour assurer leur cycle biologique. Elles figurent sur la liste rouge des espèces menacées. La passe à poissons sera équipée d'antennes de détection placées en différents points, ce qui permettra le suivi à distance des poissons en transit par la passe.

Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la question posée (règle des 3 R : Remplacement) ; en outre, il est indispensable d'avoir recourt à des poissons sauvages pour étudier leur comportement en milieu naturel. Les poissons seront capturés par pêche électrique, réalisées pendant trois ans en début de période sèche (mai-juillet). Un total de 600 poissons sera marqué par

implantation d'un PIT tag 12 ou 23 mm, à raison de 150 individus par espèce, en fonction de leur capturabilité. Il s'agit d'un minimum pour obtenir un échantillon représentatif des comportements migratoires au sein de la population et pour évaluer la variabilité temporelle de ces comportements, tout en limitant au maximum les atteintes sur les populations (Règle des 3R : Réduction). Les marques PIT tags seront implantées chirurgicalement dans la cavité péritonéale des poissons. Les animaux seront anesthésiés avant les opérations de marquage, leurs constantes vitales seront surveillées et leur réveil post-marquage assuré avant de les relâcher dans le milieu naturel à proximité du lieu de capture (règle des 3R : Raffinement).

12114 Les rivières de montagne présentent généralement un transit sédimentaire naturel important, notamment en matières en suspension (MES), variable selon les années et souvent concentré dans le temps lors d'épisodes spécifiques (orages, crues, laves torrentielles, ...). Les ouvrages hydroélectriques présents sur ces cours d'eau modifient les écoulements ainsi que le transit des sédiments à l'aval. Des opérations spécifiques (vidanges partielles de retenues, dragages) doivent être régulièrement réalisées pour évacuer les sédiments bloqués au niveau des barrages. Les exploitants sont alors tenus d'essayer de minimiser les effets de ces opérations, susceptibles d'augmenter fortement les concentrations en MES en aval des barrages et d'impacter la faune piscicole.

La zone d'étude se situe dans un cours d'eau à fort apport sédimentaire, en aval d'un barrage. Actuellement des vidanges partielles de la retenue sont réalisées plusieurs fois par an pour évacuer les sédiments, engendrant de fortes teneurs en MES. Ce mode de gestion sera remplacé en 2020 par l'utilisation d'un robot-cureur, supposé plus durable et écologique, qui devrait permettre de réduire les pics de concentrations en MES et limiter les impacts sur les poissons.

L'objectif du projet est d'évaluer le comportement de deux espèces de poissons caractéristiques des rivières de montagne (truites et chabots), en périodes de faible et de forte concentrations en MES. Le projet repose sur l'utilisation conjointe de deux techniques de marquage individuelles : la RFID et la radiotélémetrie. La RFID permet d'enregistrer le passage de poissons marqués à l'aide de micro-puces appelées PIT tags, au niveau de points de passage équipés d'antennes de détection. Ces points de passage seront localisés au niveau de 3 affluents de la rivière étudiée ; ces affluents pouvant être utilisés comme zones refuge par les poissons lors des pics de MES. La radiotélémetrie sera utilisée pour suivre à distance la position des poissons marqués à l'aide d'émetteurs radio. Des détecteurs fixes borneront le secteur d'étude pour identifier les individus sortis du système. En complément, le suivi des déplacements des poissons sera réalisé par radiopistage.

Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la question posée (règle des 3 R : Remplacement) ; en outre, il est indispensable d'avoir recourt à des poissons sauvages pour étudier leur comportement en milieu naturel. Les poissons seront capturés par pêche électrique, réalisées pendant trois ans sur le secteur d'étude et dans les trois affluents principaux, lors de campagnes printanières et automnales. Un total de 1650 poissons sera marqué par implantation d'un PIT tag (550 par an) : 1350 truites et 300 chabots. En outre, 90 truites de plus de 25 cm seront également marquées par implantation chirurgicale d'un émetteur radio (en plus du PIT tag), au cours de 3 campagnes de marquage. Il s'agit d'un minimum pour obtenir un échantillon représentatif des comportements migratoires au sein de la population et pour évaluer la variabilité temporelle de ces comportements, tout en limitant au maximum les atteintes sur la population (Règle des 3R : Réduction). Les marques PIT tags et les émetteurs radio seront implantés chirurgicalement dans la cavité péritonéale des poissons. Les animaux seront anesthésiés avant les opérations de marquage, leurs constantes vitales seront surveillées et leur réveil post-marquage assuré avant de les relâcher dans le milieu naturel à proximité du lieu de capture (règle des 3R : Raffinement). Les manipulations d'animaux seront réalisées par du personnel formé et habilité.

12115 La Directive Cadre Européenne sur l'eau fixe le bon état écologique des cours d'eau et la libre circulation des espèces piscicoles. Les propriétaires d'ouvrages transversaux doivent ainsi se mettre en conformité en équipant ou effaçant leur(s) ouvrage(s). Certains maîtres d'ouvrage sont

tenus (ou décident volontairement) d'évaluer l'efficacité de ces actions en mettant en place des suivis des comportements des poissons aux abords des ouvrages, avant et/ou après restauration. L'outil RFID est de plus en plus couramment utilisé pour quantifier ces comportements. En effet, il permet de mesurer la proportion d'individus qui cherchent à migrer vers l'amont et ceux qui parviennent effectivement à franchir l'obstacle. Il faut pour cela procéder au marquage d'individus à l'aide de micro-puces RFID appelées PIT tags et équiper les ouvrages à l'aide d'antennes de détection reliées à un lecteur-enregistreur. Pour le cas des ouvrages effacés, l'approche peut également être réalisée en utilisant des antennes et lecteurs mobiles avec prospections de linéaires de cours d'eau à pied.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de l'effacement de deux seuils transversaux infranchissables sur une rivière salmonicole. L'étude cible exclusivement la truite de rivière, et vise à mettre en lumière la restauration de la libre circulation des poissons suite aux travaux réalisés (combinée à une étude sur des marqueurs moléculaires pour évaluer les flux de gènes).

Le projet débutera avant le début des travaux et sera réalisé sur une année consécutive à la fin de ces derniers. 500 truites seront capturées par pêche électrique et marquées par PIT tags 12 et 23 mm selon leur taille. Leurs déplacements dans la rivière seront suivis uniquement par prospections mobiles à l'aide de deux lecteurs-enregistreurs portatifs.

Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la question posée (règle des 3 R : Remplacement) ; en outre, il est indispensable d'avoir recourt à des poissons sauvages pour étudier leur comportement in natura. L'effectif d'individus marqués, est le minimum pour obtenir un échantillon représentatif des comportements migratoires tout en limitant au maximum les atteintes sur la population (Règle des 3R : Réduction). En effet, seule une fraction minoritaire des individus va migrer, l'autre fraction est résidente et ne cherchera pas nécessairement à remonter la rivière. Les marques PIT tags seront implantées chirurgicalement dans la cavité péritonéale des poissons. Les animaux seront anesthésiés avant les opérations de marquage, leurs constantes vitales seront surveillées et leur réveil post-marquage assuré avant de les relâcher dans le milieu naturel à proximité du lieu de capture (règle des 3R : Raffinement).

12116 Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant et l'adulte jeune. Les épendymomes (EPN) sont des tumeurs intracrâniennes retrouvées très fréquemment chez l'enfant. Ces tumeurs sont chimiorésistantes et responsables de nombreuses rechutes malgré les exérèses chirurgicales. Au cours des dernières décennies, le traitement des EPN n'a connu aucun progrès. L'échec des traitements actuels s'explique aussi du fait qu'il n'y a qu'un faible taux de pénétration des médicaments couramment utilisées dans le tissu cérébral et donc dans la tumeur. Cette faible pénétration est liée à l'existence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui tapisse les vaisseaux sanguins cérébraux et qui permet de protéger le système nerveux central de l'intrusion de molécules toxiques. Différentes techniques ont déjà été développées afin d'augmenter la perméabilité de la BHE, dont les ultrasons en association avec des microbulles qui permet d'ouvrir la BHE de manière transitoire (entre 6 et 8 heures), localisée et sans dommages sur le tissu cérébral.

L'objectif de ce projet est de perméabiliser la BHE par des ultrasons afin d'augmenter la diffusion du carboplatine, chimiothérapie utilisée pour traiter les tumeurs gliales en clinique, dans le tissu cérébral et particulièrement dans nos modèles in vivo d'épendymomes.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle in vitro d'EPN dans le monde. La seule façon d'étudier de nouvelles stratégies thérapeutiques dans cette maladie est d'utiliser des modèles animaux. De plus, il n'existe pas de modèle alternatif permettant de mimer la BHE, c'est ainsi qu'il est indispensable d'utiliser des animaux vivants pour valider cette perméabilisation.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de réduction et raffinement. Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Les procédures seront réalisées sous anesthésie et une analgésie sera pratiquée en post-opératoire et dès l'apparition de tout signe clinique pour éviter toute souffrance. Les points limites seront strictement appliqués. Les animaux seront hébergés en

groupe et le milieu sera enrichi. L'ensemble de ce projet comprend l'utilisation d'au maximum 512 souris.

12117 La Maladie hémorragique virale du lapin (Rabbit haemorrhagic disease, RHD) est une maladie infectieuse fulgurante souvent fatale (80 % de mortalité en moyenne, en 48-72 heures) qui affecte les lapins de chair, de compagnie et sauvages (lapins de garenne) de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*. Elle est provoquée par un calicivirus du genre *Lagovirus*, le RHDV. Mise en évidence pour la première fois en Chine en 1984, la RHD a rapidement diffusée en Europe et a causé d'importantes pertes économiques dans les élevages industriels de lapins atteints. Elle a également perturbé les écosystèmes naturels en Europe occidentale pour lesquels le lapin de garenne est une espèce clé. Pour combattre cette maladie, plusieurs vaccins ont été mis sur le marché. En 2010, un nouveau génotype, le RHDV2, a émergé en France et s'est rapidement propagé en Europe et hors d'Europe. Son échappement partiel à l'immunité induite par le RHDV ou les vaccins disponibles a eu pour conséquence la réémergence de la RHD en élevage.

En l'absence d'une protection efficace contre le RHDV2 par les vaccins anti-RHDV « classique » du commerce, des vaccins permettant de vacciner contre le RHDV2 ont très vite été commercialisés. Mais il s'agit de vaccins à virus inactivés, produits sur animaux vivants, qui ont donc un coût de production élevé et qui posent d'évidentes questions éthiques. Nous souhaitons donc développer de nouveaux vaccins recombinants, afin de contourner ces deux problèmes.

Nous allons réaliser des constructions dans lesquelles la protéine immunogène VP60 de l'une ou l'autre des souches de RHDV (nommées VP60-1 ou VP60-2) sera exprimée au sein d'une souche vaccinale du virus myxomateux (SG33-MYXV), avec un mode de présentation original. Ce type de vaccin aura en outre l'avantage de vacciner contre les deux maladies en même temps (myxomatose et maladie hémorragique virale du lapin).

La souche vaccinale SG33 non modifiée du virus myxomateux (MYXV) peut induire chez les lapereaux une réaction exagérée au site d'injection. Nous allons d'abord vérifier si le nouveau mode de présentation de la protéine exogène n'interfère pas avec l'efficacité vaccinale contre la myxomatose, et si elle amène une atténuation supplémentaire de la souche SG33 (procédure 1). La vérification ultime de la protection vaccinale se fera par l'inoculation d'une souche pathogène du MYXV.

Parallèlement, l'efficacité vaccinale des protéines VP60 de RHDV sera testée en dehors d'un contexte viral, dans le cadre d'un vaccin ADN (procédure 2). L'apparition d'anticorps dans le sang des lapins permettra d'évaluer la séroconversion des animaux. Le pouvoir neutralisant de ces anticorps sera ensuite déterminé en laboratoire.

Le présent projet sur 3 ans a pour objectifs 1) de confirmer l'atténuation de virulence lorsqu'une protéine est exprimée selon la nouvelle approche envisagée, 2) d'étudier la protection conférée par différentes constructions vaccinales par suivi sérologique et séro-neutralisation de la souche pathogène RHDV2

En conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (règle dite des 3R), le nombre de lapins inclus dans le protocole expérimental a été volontairement limité.

De plus, afin de réduire d'éventuelles douleurs et angoisse des animaux, les mesures suivantes seront appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans le décret du 1er février 2013 et les arrêtés ministériels associés, en particulier l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles ;
- Enrichissement de l'environnement : les cages seront équipées d'une mezzanine, de morceaux de bois à ronger, de balles
- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;

- Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien ou de croissance des lapins) sans restriction ;

- Manipulation des lapins dans des box isolés prévus à cet effet par du personnel qualifié ;

Le nombre total de lapins utilisés sur trois ans, incluant les lapins des lots témoins non infectés, est de 50. Dans le cadre de la première procédure du projet, après infection des lapins avec la souche pathogène, les animaux seront surveillés tous les jours pendant la phase aiguë de la maladie afin de détecter une altération de leur état de santé et de procéder à leur euthanasie si les points limites que nous avons définis sont atteints.

12118 La maladie d'Alzheimer (MA) est notamment caractérisée par le dysfonctionnement d'une protéine dans les neurones du système nerveux central : la protéine Tau. Cette protéine, dont la dégradation normale est altérée dans la maladie, s'accumule et s'agrège de façon toxique dans ces neurones et finit par entraîner la dégénérescence du cerveau. Nous avons mis en évidence qu'une autre protéine, appelée ProtX, interagit physiquement et de façon fonctionnelle avec Tau. Nous avons constaté que le niveau d'expression de ProtX est faible dans le cerveau de patients atteints de la MA et que cette baisse est corrélée à l'apparition des formes pathologiques de Tau dans les neurones. De plus, nous avons détecté la présence de ProtX, conjointement avec la protéine Tau anormale, au niveau des lysosomes (vésicules impliquées dans la dégradation des protéines) suggérant un rôle potentiel de ProtX dans la dégradation de Tau. Nos données récentes *in vitro* sur des neurones en culture montrent une implication de ProtX dans le fonctionnement de cette voie de dégradation cellulaire et par conséquent sur l'accumulation de Tau.

Nous proposons dans ce projet d'étudier le rôle *in vivo* de ProtX sur la progression de cette maladie de Tau. Pour cela nous disposons au laboratoire d'un modèle de souris porteur d'une mutation du gène de Tau et générant une tauopathie (maladie de Tau). Les protéines Tau ainsi exprimées chez ces souris récapitulent certaines anomalies observées dans la pathologie humaine telles que l'accumulation et l'agrégation de Tau dans les neurones du cerveau et de la moelle épinière. Il s'ensuit une mort neuronale responsable notamment d'une paralysie des membres inférieurs commençant légèrement mais progressivement dès l'âge de 4 mois. Etant donné ce trouble moteur, des mesures d'expérimentation et d'observations ont été prises pour limiter la souffrance et le stress de ces animaux comme l'accès facilité à la nourriture dès l'âge de 4 mois. Pour mener à bien ce travail, nous envisageons de faire varier l'expression de ProtX dans ces souris au niveau du cerveau mais également de la moelle épinière afin de déterminer une amélioration potentielle de la maladie dans ces souris. Nous travaillons actuellement sur des neurones en culture issue de la moelle épinière de ces souris, ce qui ne nécessite pas de travailler sur souris vivante. La modulation de l'expression de ProtX dans ces cellules nous permet d'étudier l'impact éventuel de cette variation sur la toxicité cellulaire et sur l'accumulation et l'agrégation de Tau. Néanmoins, afin d'évaluer l'implication de ProtX sur une amélioration potentielle des altérations physiques et comportementales observées chez des souris malades, le passage sur souris vivante est nécessaire. Nous pourrions, à l'issue de cette étude, définir l'impact thérapeutique potentiel de la variation de ProtX dans ce modèle de tauopathie.

Dans un souci de répondre à la règle des 3R, l'ensemble des expériences se feront dans le respect maximum du bien-être des animaux (enrichissement du milieu, utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques pour limiter la souffrance, ...). Dans l'objectif de limiter le nombre d'animaux nécessaires, les cerveaux et moelle épinières seront prélevés et étudiés sur les animaux testés au niveau comportemental. Dans ce projet, nous envisageons de travailler sur un nombre de 1035 souris. Le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum requis tout en permettant une analyse robuste de cette étude. Néanmoins, en cas de succès rapide de nos expériences, nous mettront fin aux expériences plus tôt que prévu, limitant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

12119 Suite à une infection ou une vaccination, notre système immunitaire met en place une réponse impliquant différentes cellules et molécules qui combattent l'infection et nous protègent contre une future exposition. Les cellules B jouent un rôle central dans cette réponse en reconnaissant de façon

spécifique les agents infectieux et en produisant des anticorps qui vont se fixer à ces agents infectieux et ainsi favoriser leur neutralisation et leur élimination.

Nous travaillons sur une molécule qui contrôle la réponse immune au niveau des cellules B en favorisant leur activation, différenciation et migration. Nous avons généré un modèle murin génétiquement modifié qui comporte une mutation conduisant une fonction augmentée de cette molécule et n'ayant pas d'effet dommageable sur le bien-être animal. Afin de comprendre comment cette molécule agit sur la qualité de la réponse immune et la localisation des cellules B, nous allons étudier la réponse vaccinale dans ce modèle animal. Les procédures expérimentales consistent à mimer les réponses immunitaires suite à une infection en injectant des molécules par voie intrapéritonéale à des souris éveillées (une injection ou deux à 28 jours d'intervalle). Ce type d'injection n'entraîne aucune douleur à l'animal et la durée des expériences s'étalent sur une période de 12 jours au minimum à 51 jours au maximum. La réponse immunitaire mise en place sera suivie dans le sang par des prélèvements au niveau de la veine mandibulaire (joue de la souris) 1 fois par semaine sur souris éveillée. Afin de connaître plus précisément l'importance de notre molécule d'intérêt dans la réponse immunitaire, nous utiliserons également des souris chimères (souris non transgéniques ayant subi une irradiation permettant d'éliminer leur système immunitaire et de le remplacer par un système immunitaire de souris transgéniques après injection par voie intraveineuse de cellules souches).

Au total ce projet nécessite l'utilisation de 1008 souris tous génotypes confondus sur une période de 5 ans. L'étude concernant la réponse immunitaire après immunisation nécessitera 792 souris et 216 souris chimères.

Notre projet est construit en respectant la règle des 3R. Tout d'abord, les réponses immunitaires impliquent de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires et se mettent en place dans des structures complexes permettant le dialogue entre les différentes populations de cellules immunitaires. Il est donc impossible de remplacer totalement le modèle animal par des études in vitro. Nous réduirons néanmoins au maximum le nombre d'animaux utilisés pour ce projet tout en restant dans une proportion suffisante pour avoir des résultats statistiques sûrs et précis. Nous veillerons au bien-être animal en réalisant une surveillance quotidienne à l'aide d'une fiche d'évaluation se basant sur différents aspects (comportement, attitude physique, poids). Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt qui lorsqu'ils sont atteints conduiront à l'euthanasie de la souris. A l'issue de chaque procédure les animaux seront euthanasiés.

12120 Dans le cadre d'une collaboration, nous évaluerons l'efficacité d'un traitement avec une molécule d'intérêt thérapeutique sur un modèle du X fragile chez la souris Fmr1. La délétion génétique de la protéine conduit à des altérations de la rétine sur le plan moléculaire et fonctionnelle. Par conséquent, la réversibilité du phénotype rétinien est apparue comme un marqueur pertinent de l'efficacité d'un traitement. Ainsi, nous évaluerons, l'efficacité potentielle d'une molécule à visée thérapeutique en évaluant la fonction rétinienne par électrorétinographie. L'électrorétinographie est une technique non-invasive qui permet d'enregistrer la réponse électrophysiologique de la rétine à une stimulation lumineuse. Sur la base de notre expérience et en conformité à la règle des 3R, le nombre d'animaux sera limité à la quantité minimale suffisante pour atteindre les objectifs. Avant les enregistrements, les animaux seront maintenus dans des conditions de stabulation contrôlées (hygrométrie, température et éclairage) ; des accessoires (rouleau de carton, coton) sont ajoutés dans les cages. Afin de limiter le stress et l'angoisse, les animaux sont manipulés par le même expérimentateur dans le respect de l'animal. Les protocoles expérimentaux sont établis avec rigueur. Afin de mener à bien ce projet, nous utiliserons 84 souris sur 1 an. Le recours à l'animal est indispensable à l'étude de molécule à visée thérapeutique dans le cadre des essais précliniques. De plus, aucune technique alternative ne permet d'évaluer la fonction rétinienne dans des conditions physiologiques.

12121 Dans ce projet nous allons étudier la faisabilité d'une approche de thérapie génique pour l'hypophosphatémie liée à l'X (XLH). L'XLH est une maladie rare se traduisant principalement par une fragilité des tissus minéralisés (os et dents). Les patients sont de petite taille et souffrent de

douleurs dentaires, osseuses, voire même de douleurs musculaires. Leurs os sont plus fragiles. Les patients présentent également de faibles niveaux de phosphate dans le sang ainsi que des niveaux de FGF-23 (facteur de croissance du fibroblaste 23) augmentés. Le FGF-23 agit au niveau rénal en diminuant la réabsorption du phosphate dans le sang. Il n'existe actuellement aucun médicament curatif de cette maladie, la prise en charge thérapeutique actuelle consistant en l'apport de phosphate et de calcitriol (forme active de la vitamine D, qui favorise l'absorption du phosphate dans les intestins). Néanmoins, ce traitement ne permet pas d'inverser complètement la maladie: les os restent fragiles et déminéralisés, nécessitant dans les cas les plus sévères des opérations chirurgicales répétitives. La déminéralisation des dents favorise également l'apparition d'abcès, pouvant donner lieu à des infections. Par ailleurs, le traitement par apport de phosphate peut entraîner une hyperparathyroïdie.

Un modèle murin spontané de cette pathologie existe: les souris HypDuk. Ces souris reproduisent la pathologie observée chez les patients: petite taille, hypophosphatémie, augmentation des taux de FGF-23.

Nous avons développé une stratégie thérapeutique qui consiste à utiliser un virus adéno-associé (AAV) pour diminuer le taux de FGF-23 (AAV-FGF23). Les expérimentations consisteront à évaluer les effets de l'AAV-FGF23 sur des souris HypDuk. Afin de répondre à la règle des 3R, nos vecteurs viraux ont d'abord été testés in vitro sur des modèles cellulaires (remplacement), afin de sélectionner les meilleurs candidats : sur 10 candidats à l'origine, nous en avons retenus 5. Cela nous a permis d'économiser 25 souris (effectifs de 5 par groupe expérimental). Cependant, il est indispensable de tester l'efficacité de notre traitement dans un organisme entier car il est nécessaire d'évaluer dans le temps et de façon prédictive l'effet au niveau des différents organes, notamment au niveau des organes et tissus ciblés (os, sang et muscles) et de valider l'absence d'effets indésirables sur les autres tissus.

Cette étude utilisera le minimum d'animaux possible pour avoir des résultats statistiquement interprétables (réduction). Afin de réduire encore le nombre d'animaux, nous procéderons par étapes en sélectionnant d'abord le candidat le plus prometteur, puis la dose, l'âge d'injection, au lieu de réaliser toutes ces études en même temps. De plus, nous évaluerons le maximum de paramètres requis sur les mêmes animaux dans la même expérience pour limiter leur utilisation. Afin de minimiser la souffrance, lors des prélèvements sanguins, les souris seront anesthésiées sous isoflurane (raffinement).

Dans ces études, nous prévoyons d'utiliser 170 souris. Ce nombre est estimé en fonction d'une analyse statistique prédictive (test de comparaison des moyennes) afin d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible. Les souris seront élevées et reproduites dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 5 ans.

12122 Le cancer du côlon représente le second cancer le plus fréquent chez la femme et le troisième chez l'homme. Or près de 50% de ces cancers entraîneront la formation de métastases (touchant principalement le poumon et le foie). Le traitement de ces cancers repose à la fois sur la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. L'efficacité de la radiothérapie ou de la chimiothérapie s'explique par la mort des cellules tumorales, induite de différentes façons en fonction du traitement choisi. Mais l'efficacité anti-tumorale est plus complexe et dépend aussi du microenvironnement tumoral, avec qui les cellules tumorales communiquent en permanence. Dans la majorité des cas, le métabolisme mitochondrial est crucial pour le développement de la tumeur et des métastases et leur réponse aux agents anticancéreux (chimiothérapie, radiothérapie). Etant donné que presque toutes les protéines mitochondriales sont codées par l'ADN nucléaire et importées dans l'organelle, les machineries d'import mitochondriales ont évolué afin de répondre aux besoins de la cellule, particulièrement pour la cellule cancéreuse. L'objectif de ce projet est donc d'étudier l'impact de la perturbation du complexe d'import mitochondrial sur le développement de cancers métastatiques du côlon.

Pour réaliser ce projet, des cellules tumorales humaines (HCT116) plus ou moins modifiées au niveau de leur système d'import mitochondrial seront injectées par voie intraveineuse (IV) de souris immunodéficiente BALB/C Nude, sous anesthésie. Ce modèle nous permet de mimer la formation

de tumeurs métastatiques, se formant principalement dans les poumons. Dans le but de caractériser au mieux la réponse des cellules tumorales dans notre modèle, 2 procédures seront réalisées :

- 1) détermination de la quantité optimale de cellules tumorales à injecter par voie IV ;
- 2) effet de la perturbation de la machinerie d'import mitochondriale sur le développement des métastases.

Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 140.

Le processus tumoral requiert la synthèse de cellules, puis leur modulation par différents acteurs présents dans le microenvironnement tumoral que nous ne maîtrisons pas encore aujourd'hui. La formation de tumeurs métastatiques nécessite l'utilisation de ce modèle expérimental. Aucune technique alternative au modèle animal ne peut remplacer aujourd'hui ce système complexe qu'est la souris. La souris est l'animal le plus utilisé dans le domaine de la recherche préclinique en oncologie, fournissant des résultats qui ont permis à de nombreux traitements d'être testés chez l'homme avec le moins de risque et le plus de chance de réussite. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Les animaux seront anesthésiés (isoflurane) pour les procédures d'administration i.v. des cellules. Un suivi pondéral et clinique régulier des animaux (état général, comportement etc...) sera réalisé. Une attention particulière sera portée au respect des points-limites adaptés fixés (comportement, état général, signes de douleur). Les animaux étant immunodéprimés, ils seront hébergés dans des conditions maximales de protection et leur manipulation se fera au maximum sous hotte. Si les animaux contractent des infections ou tombent gravement malades, ils seront euthanasiés. L'impact sur la capacité des souris à satisfaire leurs besoins physiologiques et éthologiques sera limité au strict minimum en enrichissant leur environnement par du coton ou des nids en carton et en leur permettant de vivre en groupes de 2 à 5 souris. Des mesures seront prises pour mettre fin dans les délais les plus brefs à toute anomalie ou à toute douleur, toute souffrance, toute angoisse ou tout dommage durable constatés qui pourraient être évités en définissant des points limites précis et adaptés. L'euthanasie des animaux sera effectuée par une personne compétente de l'établissement utilisateur en limitant le plus possible la douleur, la souffrance et l'angoisse des souris,.

12123 Les préparations à base d'écorces de *Vitex doniana* ou de *Pericopsis laxiflora* sont utilisées dans la médecine traditionnelle ivoirienne pour traiter de nombreuses maladies. Cette utilisation des plantes est ancestrale et repose généralement sur une tradition orale qui se transmet de génération en génération. Notre projet s'intéresse aux effets bénéfiques de différentes solutions préparées à partir d'écorces collectées sur les marchés traditionnels ivoiriens. Plus précisément, ces plantes étant régulièrement prescrites pour diminuer la tension artérielle des patients hypertendus, nous nous intéresseront dans un premier temps aux effets de ces plantes sur l'élimination de l'eau par les reins et dans un second temps sur la tension artérielle.

Afin de procéder à cette étude nous avons choisi de travailler sur deux modèles animaux de rongeurs (106 rats), le premier avec des animaux sains et le second avec des animaux hypertendus, car l'effet attendu sur l'élimination de l'eau ne peut pas être mesuré sur des modèles cellulaires ou des modèles informatiques. Brièvement, les animaux recevront un traitement oral pendant 5 jours puis nous isolerons les animaux pour recueillir individuellement leur urine pendant 24h. La tension artérielle des animaux sera comparée entre avant et après la période de traitement.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés dans ce protocole nous avons prévu un programme par étapes. En effet, seules les solutions présentant un effet sur l'élimination de l'eau chez des animaux sains seront utilisées chez les animaux malades. En outre, les animaux sains issus du groupe contrôle (pas de traitement) seront réemployés et rendus malades (hypertendus).

Enfin, au terme du protocole les animaux sains pourront être gardés en vie et potentiellement réexploités pour d'autres protocoles. En effet, aucune toxicité n'étant attendue, ces animaux

devraient parfaitement tolérer le protocole et ne devraient présenter aucun signe de souffrance ni aucune conséquence délétère. Les animaux devenus hypertendus seront suivis jusqu'à disparition de la pathologie et remis en circulation s'ils retrouvent leur état normal. Dans le cas contraire ils seront sacrifiés. Les animaux seront surveillés et pesés quotidiennement. Si un animal présente des signes d'inconfort, du paracétamol sera administré dans l'eau de boisson.

12124 L'hypertension pulmonaire est caractérisée par une élévation de la pression dans les artères pulmonaires. Il s'agit d'une maladie rare mais grave, conduisant au décès des patients. Les traitements actuels n'étant pas curatifs, nous cherchons à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans cette maladie. Pour cela, nous travaillons sur des modèles de cette maladie chez le rat déjà développés au laboratoire, mais qui ne reproduisent pas toutes les caractéristiques de la pathologie humaine.

Un nouveau modèle dit SUGEN/hypoxie alliant l'injection d'un composé appelé SUGEN (ou SU5416) et une exposition à une hypoxie chronique, c'est à dire soumis à un manque d'apport en oxygène au niveau de l'organisme, a été décrit dans la littérature. Ce modèle présente certaines caractéristiques plus proches de la maladie humaine que les autres modèles. En particulier, le remodelage et l'inflammation dans les artères pulmonaires sont plus intenses. On identifie de plus dans ce nouveau modèle des lésions de remodelage appelées lésions plexiformes qui existent dans la maladie humaine mais pas dans les modèles animaux utilisés jusqu'à présent au laboratoire. Ainsi, nous souhaitons dans ce projet développer ce modèle SUGEN/hypoxie au laboratoire et caractériser ses différents aspects physiopathologiques.

Pour cela, les rats seront traités in vivo à l'aide du composé SU5416 qui sera injecté par voie sous-cutanée. Les animaux seront ensuite placés dans un caisson hypobare permettant de générer une hypoxie chronique pendant 3 semaines. Puis les animaux seront sortis du caisson et replacés en environnement normoxique pendant 5 semaines supplémentaires. A la fin de ce protocole, nous mesurerons in vivo la pression artérielle pulmonaire et le débit cardiaque chez ces animaux (procédure réalisée sous anesthésie). Les rats seront ensuite euthanasiés afin de prélever des organes pour des expériences ex vivo complémentaires.

Pour mettre en place ce nouveau modèle au laboratoire la règle des 3R a été mise en place. En effet, l'utilisation d'animaux dans ces expériences est indispensable pour étudier l'hypertension pulmonaire. En effet, les phénomènes développés dans la maladie sont complexes et ne peuvent être modélisés dans leur ensemble dans un système cellulaire in vitro (Remplacement). Cependant, une planification précise des expériences a été établie afin de réduire au maximum le nombre d'animaux inclus dans cette étude, et nous proposons un projet portant sur 192 rats (Réduction). Une attention permanente sera portée au bien être des animaux avant et tout au long du protocole, notamment en assurant leur surveillance quotidienne et un enrichissement adéquate de leur milieu : papier tressé, morceaux bois, tunnel et maison en carton (Raffinement). L'injection du SUGEN n'est pas connue pour provoquer des douleurs, et la souffrance est considérée comme faible dans ce protocole. Toutefois, une surveillance des animaux sera réalisée après l'injection, de manière à détecter tout signe de stress et/ou de douleur. Si nécessaire, une administration d'antalgique sera réalisée dans un premier temps. En cas de souffrance ou de détresse persistante pour l'animal, une procédure d'euthanasie sera mise en œuvre. Les mesures du débit cardiaque et de la pression artérielle pulmonaire seront réalisées sous anesthésie afin d'éviter le stress et/ou la perception de la douleur, et les animaux seront euthanasiés sans réveil à la fin de ces expérimentations.

Suite aux résultats obtenus dans ces expériences, nous passerons à des expériences sur cellules humaines en culture pour étudier les mécanismes mis en jeu. Ceci nous permettra ainsi de ne pas utiliser d'animaux dans cette partie de nos recherches.

12125 La microchirurgie est une technique fréquemment employée dans de nombreuses spécialités chirurgicales.

L'objectif principal du Diplôme Universitaire (DU) en Recherches Microchirurgicales est de préparer les chirurgiens en formation (venant de spécialités diverses) à l'utilisation du microscope et à la pratique de la microchirurgie.

La formation pratique est dispensée au centre d'enseignement spécialisé universitaire. Le laboratoire de microchirurgie dispose de tous les équipements nécessaires (animalerie dédiée, cinq postes d'entraînement, matériel d'anesthésie...) et du personnel formé, compétent et expérimenté. L'entraînement se fait d'abord sur modèle inerte (simulateur de microsuture puis micro-vaisseaux disséqués à partir de cuisse de poulets des commerces destinés à la consommation) puis sur rats. Les montages vasculaires et nerveux de difficulté croissante sont enseignés de manière progressive tout au long de cette formation.

Le rat a été choisi pour les similitudes de son réseau artério-veineux fémoral avec les micro-vaisseaux humains.

Les rats seront hébergés en cage de type III durant la période d'acclimatation. Chaque cage sera agrémentée de carfil nesting, des petites bandes de papier kraft recyclé, sans poussière, inoffensif pour le milieu et propre afin d'amener un enrichissement aux rats et les stimuler dans la réalisation de leur propre nid au sein de la cage. Les rats seront hébergés en groupes de 2-3 animaux par cage.

Afin de respecter la règle des 3R, le projet pédagogique a été pensé de manière à mettre en place plusieurs dispositions pour réduire l'effectif de rats nécessaire. Les étudiants valideront la technique du maniement des instruments et des fils de sutures sur simulateur de microchirurgie. Les étudiants valideront ensuite l'apprentissage de la dissection des vaisseaux et la réalisation de chacune des 4 types d'anastomoses sur cuisses de poulet du commerce. La bonne réalisation de chaque anastomose sera vérifiée par injection de produit de contraste au sein des vaisseaux (bleu de méthylène) afin de repérer d'éventuelles fuites ou des points transfixiants. Les étudiants devront réussir 5 montages pour chaque type d'anastomose avant de démarrer leur apprentissage sur rat.

En ce qui concerne le raffinement, le choix des instruments est adapté aux techniques de chirurgie « classique » micro-invasive afin d'éviter les lésions et délabrements superflus des tissus, sources de douleurs.

Les étudiants devront ensuite réaliser 3 montages pour chaque type d'anastomose sur rat. Les rats seront maintenus sous anesthésie générale par injection intrapéritonéale de Kétamine et Domitor après induction de l'anesthésie générale par inhalation de gaz halogéné (Sévoflurane) dans une chambre d'induction durant toute la procédure opératoire. Le contrôle immédiat de la bonne réalisation de chaque montage sera réalisé avant la fermeture cutanée. Un traitement par un analgésique en sous-cutanée sera réalisé en post-opératoire immédiat.

Le Diplôme Universitaire (DU) en Recherches Microchirurgicales a pour vocation de former 10 chirurgiens destinés à pratiquer la microchirurgie chaque année. Chaque chirurgien devra réussir au total 12 montages, avec un taux d'échec estimé à 20%, nécessitant donc 15 rats par chirurgien. Le nombre de rats nécessaire à cet enseignement est de 15 rats par chirurgiens soit 150 rats par promotion chaque année, un total de 750 rats pour les 5 ans.

12126 L'organisation mondiale de la santé considère aujourd'hui les maladies autoimmunes comme une priorité sanitaire. Parmi elles la sclérose en plaques (SEP), dont l'incidence a fortement augmenté durant ces dernières années. Malgré les différentes interventions thérapeutiques existantes, il n'existe pas de traitement définitif de la maladie. Il est donc nécessaire d'améliorer notre connaissance des mécanismes physiopathologiques à l'origine de la maladie. Les modèles animaux représentent un outil incontournable dans l'étude de cette maladie, en effet les mécanismes immunopathologiques découverts à l'aide des modèles murins sont similaires chez l'homme. Dans la littérature dans le domaine de l'autoimmunité, le rôle des peptides antimicrobiens (AMP) a récemment été décrit. Des études récentes révèlent que les AMPs régulent de nombreuses fonctions physiologiques et, par conséquent, la production dérégulée de certains AMPs a été associée à diverses maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde, lupus, diabète...). Notre projet a

pour but de mieux comprendre le rôle du peptide antimicrobien cathélicidine dans le développement de la SEP dans un modèle murin: l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).

Les modèles animaux représentent un outil incontournable dans l'étude de la sclérose en plaques, en effet les mécanismes immunopathologiques découverts à l'aide des modèles murins sont similaires chez l'homme. L'EAE est le modèle murin de la sclérose en plaques le plus utilisé, il permet d'étudier le développement de la réponse auto-immune dans le système nerveux central (SNC) et de tester de nouvelles approches thérapeutiques. L'EAE est induite par immunisation contre une protéine exprimée dans le SNC (myéline).

Dans notre projet, nous évaluerons différents paramètres immunitaires potentiellement régulés par la cathélicidine durant le développement de l'EAE. Les souris seront traitées par injection intrapéritonéale de cathélicidine et en parallèle l'EAE sera étudiée dans des souris invalidées pour le gène de la cathélicidine. Le rôle de la cathélicidine sur le développement de l'EAE sera suivi durant 30 jours.

L'effet de la cathélicidine ou de son absence sera évalué dans le SNC. Pour évaluer son action sur les différents paramètres du SNC nous utiliserons des tests statistiques non-paramétriques en comparant les souris traitées versus non-traitées et les souris sauvages versus invalidées.

Le nombre de souris utilisées sera de 880 pour les 5 ans de ce projet.

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement robustes. Certains paramètres expérimentaux, tels que les doses testées, ont déjà été déterminés in vitro ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. Les molécules utilisées étant naturellement produites dans l'organisme aucune toxicité de ces molécules n'a été décrite. L'état général de l'animal, la perte de poids, son apparence et son comportement seront suivis quotidiennement après traitement. Après l'induction d'EAE, les animaux seront euthanasiés dès qu'une perte de poids de plus de 20% par rapport au poids initial sera observée. L'expérimentation sera ainsi interrompue avant le développement de complications aiguës pouvant causer une douleur à l'animal.

A terme, les résultats générés par ce projet permettront de mettre à jour de nouveaux mécanismes de régulation du développement de la SEP et à long-terme ce projet permettra d'élaborer, contre cette maladie, de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation des peptides antimicrobiens.

12127 Le purpura thrombotique thrombocytopénique acquis (PTT-a) est une maladie rare et grave, touchant le plus souvent l'adulte jeune. Les manifestations de cette pathologie sont une baisse du nombre de plaquettes, une baisse de l'hémoglobine et une souffrance brutale d'un ou plusieurs organes comme le rein et le cerveau. Sans prise en charge adaptée, 90% des patients décèdent.

Le PTT-a est lié à la formation de caillots de plaquettes dans les petits vaisseaux de l'organisme, les plaquettes s'agrégeant sur des grandes protéines : les multimères de von Willebrand (VWF-HM), ces multimères étant dégradés par l'enzyme ADAMTS13 en situation physiologique. Deux événements sont nécessaires pour déclencher la maladie : premièrement le système immunitaire des patients inactive l'enzyme ADAMTS13, qui ne peut alors plus dégrader les multimères de von Willebrand ; et deuxièmement l'activation des cellules endothéliales qui vont libérer brutalement de grandes quantités de VWF-HM.

Notre projet de recherche vise à évaluer l'efficacité de l'ITF1697 d'un peptide dans un modèle de souris atteinte de PTT. Ce peptide récemment développé a la propriété d'inhiber la libération du VWF-HM par les cellules endothéliales.

Le modèle de souris atteinte de PTT sera développé tel qu'il a été développé aux USA: nous utiliserons des souris dont le gène codant pour la protéine ADAMTS13 a été « éteint », prédisposant ainsi les souris à la maladie (les souris KO ADAMTS13 sont obtenues en collaboration, et l'élevage et le maintien de la souche se feront à Marseille) ; la maladie sera déclenchée par injection de Shigatoxine (protéine connue pour fortement activer l'endothélium) ; les souris seront alors traitées

par le peptide d'intérêt qui sera administré de manière continue par mise en place de pompe micro-osmotique dans la cavité abdominale sous anesthésie générale.

Le nombre de souris nécessaire pour démontrer cette efficacité du peptide a été évalué par des tests statistiques à 96 souris KO ADAMTS13 : 6 groupes de souris avec 14 souris par groupe + 12 souris pour réaliser une courbe de survie.

Selon le règle des trois R (« réduire, raffiner, remplacer »), nous serons attentifs aux procédures pour limiter la souffrance des souris et aux procédures de raffinement : la mise en place des pompes micro-osmotiques se fera sous anesthésie générale ; dès la mise en place de la pompe l'animal sera placé en hébergement seul enrichi ; les animaux seront observés quotidiennement, l'état clinique et la souffrance seront évalués à partir d'une grille d'évaluation adaptée, avec notamment évaluation des critères physiques et comportementaux permettant d'instaurer et d'adapter les mesures à visée antidouleur.

Pour 84 souris, nous analyserons les paramètres biologiques d'activité du PTT (ponction cardiaque avant sacrifice), et nous réaliserons une étude histologique (les organes des souris seront observés au microscope), et une courbe de survie sera réalisée pour 12 souris (4 souris dans 3 groupes), sur une durée de 6 mois, avec surveillance d'un score jusqu'aux points limites nécessitant l'euthanasie (détail du score fourni en annexe 1).

Nous attendons du traitement par le peptide une diminution de la gravité de la maladie, à savoir une diminution du nombre de caillots au niveau des organes de la souris et une survie augmentée.

Pour finir, en axant notre recherche sur un aspect découvert récemment de la physiopathologie du PTT, notre étude porte un projet thérapeutique innovant que nous pensons prometteur à court terme, à la lumière de données expérimentales et théoriques encourageantes.

12128 La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age ou DMLA est aujourd'hui la première cause de handicap visuel chez les personnes âgées de plus de 50 ans dans les pays développés. Cette maladie est une atteinte de la macula, la partie centrale de la rétine à l'arrière de l'œil qui permet la vision fine. Il existe de nombreuses formes de la maladie dont une forme « néovasculaire » dite humide qui va nous intéresser ici. Cette forme se caractérise par le développement de nouveaux vaisseaux dans la région maculaire. Ces vaisseaux sont anormaux et fragiles, ils laissent diffuser du sérum pouvant entraîner un décollement séreux et aboutissant à une hémorragie.

Il existe plusieurs traitements de la forme exsudative dite humide mais aucun d'eux n'est satisfaisant à l'heure actuelle, car bien que stabilisant la maladie, voire dans certains cas la faisant régresser, ils ne peuvent pas la guérir. L'administration de ces produits se fait par voie intra vitréenne, c'est-à-dire à l'intérieur même de l'œil. Ils sont indiqués dans les phases actives de la maladie mais reste inefficaces sur les formes cicatrisées ou trop évoluées. En ce qui concerne le traitement des formes atrophiques, il semble que des traitements préventifs et/ou de bonnes habitudes alimentaires puissent réduire les risques d'évolution vers une forme avancée de la DMLA. Pour certains patients le médecin ophtalmologiste prescrira des compléments alimentaires pour couvrir ou renforcer les besoins quotidiens en antioxydants, lutéine et oméga-3.

Le resvératrol, un polyphénol de la vigne est étudié pour ses propriétés pléiotropiques sur le stress oxydant, l'inflammation et la dégénérescence. Nous collaborons avec des laboratoires pharmaceutiques afin de développer un programme de recherche visant à établir si un nutraceutique à base d'oméga-3, d'oligoélément et enrichie en resvératrol pouvait exercer une action bénéfique, dans le cadre de la DMLA, supérieure à une formulation commercialisée ne contenant pas de resvératrol.

Notre modèle expérimental de DMLA consiste chez la souris en une néovascularisation choroïdienne initiée par des impacts lasers : 45 souris C57B6/6J femelles réparties en 5 groupes seront complémentées en amont avec ou sans formulation. Les animaux bénéficient de l'administration des formulations sous forme de céréales chocolatées enrichies avec ou non nos composés pendant 2 semaines avant impacts laser. Cette alimentation est maintenue jusqu'à mise à mort des animaux. Les impacts laser sont réalisés sous anesthésie générale des animaux, et dès lors, les animaux sont surveillés au jour le jour (vigilance, comportement, poids...). Les animaux

seront mis à mort 21 jours après impact laser, ce délai étant suffisant pour visualiser les effets des impacts laser sur le développement d'une néovascularisation choroïdienne et l'effet des différentes formulations sur cette dernière. Afin de pouvoir se conformer au principe de la règle des trois R (Remplacer, Réduire et Raffiner), nous avons préalablement à cette demande effectuée des expériences préliminaires sur des lignées rétinienne de manière à connaître les effets attendus sur les voies de signalisation et la production de la protéine impliquée dans la formation de nouveaux vaisseaux, nous avons réduit le nombre d'animaux nécessaire tout en gardant un nombre d'animaux minimum permettant une étude statistique. Enfin, nous avons raffiné de manière à réduire la souffrance et le stress de l'animal en éliminant notamment toute forme d'administration par d'injection ou par gavage, l'administration du nutraceutique se fera par absorption sur une petite céréale.

12129 Au cours de la croissance, les interactions entre tissus vont coordonner la croissance des différents organes composant la tête. Ces interactions vont permettre d'acquérir ou bien de maintenir certaines fonctions propres à la vie de l'individu. Elles vont également permettre de contrôler les zones de remodelisation de l'os et l'intensité de ce processus. Le rôle de ces interactions dans l'expression des différences entre espèces et à plus long terme dans la dynamique d'évolution des groupes de rongeurs reste peu compris.

Ce projet veut :

- Etudier la mise en place de la diversité des crânes et en particulier de la mandibule chez les rongeurs au cours de leur développement après naissance
- Evaluer l'importance des processus de remodelisation osseuse lors de cette mise en place post-natale

Trois espèces (souris, hamsters et gerbilles) seront utilisées. Trente cinq individus par espèce seront utilisés au cours de ce projet, soit cent cinq individus au total. Ce nombre d'individus est le minimum pour obtenir des résultats fiables et exploitables (Réduction). L'emploi de rongeurs vivants est nécessaire afin de suivre la croissance osseuse (Remplacement). Les animaux seront suivis en effectuant des visites régulières pour surveiller leur état de bien être (Raffinement).

La forme du crâne en 3D et ses variations au cours de la croissance seront étudiées par microtomographie à rayons X et par l'analyse de configuration de points remarquables (morphométrie géométrique).

12130 Les neuropathies périphériques induites par les anticancéreux (toxicité neurologique des anticancéreux) sont un véritable problème en oncologie. En effet, les cancers sont des pathologies de plus en plus fréquentes dans les pays occidentaux, et en fonction de l'anticancéreux et des doses cumulées, ces neuropathies peuvent affecter jusqu'à 90% des patients, comme avec l'oxaliplatine (anticancéreux de référence dans le cancer colorectal). Ces neuropathies sont associées à des paresthésies (fourmillement), des dysesthésies (hypersensibilités tactiles ou thermiques douloureuses) et à des douleurs spontanées affectant principalement les extrémités des membres (distribution en gants et chaussettes). Or à ce jour, aucun traitement n'a démontré une efficacité univoque et les oncologues sont alors contraints de diminuer les posologies d'anticancéreux voire d'arrêter les traitements anticancéreux, au risque d'induire des neuropathies responsables de fortes comorbidités (dépression, troubles du sommeil, baisse de la qualité de vie) chez des patients déjà atteints d'un cancer ou en rémission d'un cancer.

Ainsi, une meilleure connaissance des mécanismes de ces neuropathies iatrogènes (induites par les traitements) apparaît nécessaire, afin de développer de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre ces neuropathies.

L'objectif de ces travaux consiste à explorer les modifications induites par ces neuropathies dans la moelle épinière et dans le système nerveux périphériques (nerfs périphériques) pour proposer de nouvelles cibles thérapeutiques à partir de modèles animaux (rat) reproduisant ces troubles neurologiques après l'administration d'anticancéreux à l'animal.

Démarche éthique (règle des 3Rs) :

Le nombre d'animaux nécessaire a été réduit au maximum. Ainsi, 150 rats mâles de souche Sprague-Dawley seront nécessaires. Le modèle animal choisi est validé scientifiquement. D'autre part, les tests comportementaux utilisés sont validés et bien maîtrisés dans notre équipe de recherche. Enfin, le recours à des modèles « non animaux » (ex vivo ou in vitro) n'est pas possible pour une étude comportementale des signes d'atteintes neurologiques et pour tester l'efficacité de nouveaux médicaments antalgiques. Seule la complexité d'un organisme vivant entier peut permettre une telle approche. Les points limites sont adaptés à ce type d'expérimentation (léchage excessif, prostration, vocalisation ou perte de poids excessive de +10%) conduira à l'euthanasie rapide des animaux par inhalation de CO₂ (ces comportements n'ont jamais été observés dans notre laboratoire pour ces protocoles de neuropathies induites par les anticancéreux).

Avantages et dommages :

Ce type de modèles animaux de neuropathies induites par les anticancéreux est largement décrit dans la littérature scientifique et fait partie du gold-standard pour l'étude de la physiopathologie et l'exploration de nouvelles pistes thérapeutiques pour de futures essais chez l'homme.

Cependant ces modèles animaux bien que raffinés ne permettent pas de garder les animaux en vie à l'issue de l'étude.

12131 L'annexine A1 (ANXA1), protéine connue pour ses propriétés anti-inflammatoires, est associée à l'agressivité de différents cancers dont le mélanome et le cancer du sein triple négatif (CSTN). Des études cliniques ont montré que la survie sans métastases de patients atteints de mélanome est inversement proportionnelle au niveau d'expression de l'ANXA1 dans les mélanomes primitifs. D'autre part, une corrélation entre cette protéine et l'agressivité du cancer du sein a également été mise en évidence, les tumeurs exprimant l'ANXA1 sont associées à un phénotype triple négatif. ANXA1 est en effet impliquée dans de nombreux processus incluant la prolifération, la migration/invasion des cellules tumorales mais également la réponse du système immunitaire dans la progression tumorale et/ou dans la réponse/résistance aux traitements. Cette protéine peut activer la migration et l'invasion des cellules tumorales mais également modifier l'immunité en contrôlant certaines cellules du système immunitaire. ANXA1 peut être considérée comme une cible émergente d'intérêt dans le mélanome et le CSTN. Dans cette étude nous nous proposons d'évaluer son potentiel thérapeutique dans des modèles précliniques de mélanome et de CSTN. ANXA1 ayant un rôle dans l'immunité, il est nécessaire de réaliser une partie nos études dans des modèles syngéniques immunocompétents.

Cependant, il est aussi requis de réaliser des études sur des lignées humaines implantées sur des animaux immunodéprimés.

Une première étude (Etude A : Mise au point des modèles précliniques) sera réalisée sur des modèles de CSTN et de mélanome. Cette première étude permettra de caractériser les modèles in vivo en fonction de leur croissance et de leur capacité invasive. Cette mise au point servira également à raffiner les études suivantes (B à D) en sélectionnant une seule lignée humaine de CSTN. Cette expérience préliminaire nous permettra également de réaliser des études ex vivo sur les tumeurs. Dans cette étude 144 souris seront utilisées.

La seconde étude (Etude B : Immunothérapie) visera à étudier le blocage de l'activité d'ANXA1 extracellulaire par immunothérapie via un anticorps reconnaissant les protéines ANXA1 natives humaines (modèles xéno greffes) et murines (modèles syngéniques). L'effet de ce blocage sera évalué sur le développement tumoral et sur la formation de métastases. Cette étude comportera 360 souris.

En fonction des résultats de l'étude B, une troisième étude sera réalisée (Etude C : Biodistribution qui ne peut être réalisée que sur l'animal entier) afin d'évaluer la biodistribution de l'Ac anti ANXA1 dans les différents modèles sélectionnés dans l'étude A. Cet anticorps sera radiomarqué par l'indium-111 afin de suivre en imagerie gamma et par prélèvement à différents temps, le profil d'expression d'ANXA1 dans les souris. Le challenge sera d'imager ANXA1 extracellulaire dans la/les tumeur(s). Dans cette étude 384 souris seront utilisées.

Les études B et C détermineront ainsi la faisabilité ou non de la dernière étude (Etude D : Radio immunothérapie -RIT) qui visera à étudier l'effet d'un Ac dirigé contre l'ANXA1 radiomarqué par le lutétium-177 sur la croissance tumorale et la survie d'un modèle préclinique de mélanome et de CSTN (sélection en fonction des résultats des études A à C). Cette étude nécessitera 168 souris.

Ces expériences seront réalisées dans le respect de la règle des 3Rs, utilisant des conditions de stabulation, de bien être animal et un nombre optimisé de souris. L'ensemble du projet comprendra 1056 animaux sur 5 ans. Le nombre d'animaux est réduit au maximum et le bien-être animal est assuré par une surveillance quotidienne et des conditions d'hébergement optimisées. En effet les animaux seront hébergés dans des cages de 435cm² contenant de l'enrichissement de milieu (cabane, coton, bois à ronger) afin de favoriser le comportement naturel des animaux et limiter ainsi leur angoisse. Les cages seront placées dans des portoirs ventilés individuellement avec un cycle de lumière 12h/12h dans une pièce d'hébergement thermostatée à 24°C dans le but de respecter les normes d'ambiances de l'espèce. Pour limiter le risque infectieux le changement des cages et des litières sera réalisé de façon hebdomadaire.

Afin d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance lors des expérimentations, les animaux seront anesthésiés à l'isoflurane (cage d'anesthésie puis masque adapté à l'espèce). Suite à ces expérimentations les animaux seront en plus du contrôle quotidien, observés de façon plus poussée trois fois par semaine avec notamment le suivi de la croissance tumorale (sur animal anesthésié à l'isoflurane) et du poids. Si un animal présente une perte de poids anormale, ou un comportement suspect indiquant un mal-être ou une douleur ou atteint le point limite il sera euthanasiés (dislocation cervicale sous anesthésie) dans les plus brefs délais.

12132 Considéré comme la nouvelle pandémie de notre siècle, le diabète affecte 246 millions de personnes à travers le monde. Son étude et la mise en place de traitements adaptés constituent donc une priorité de santé publique. L'apparition de neuropathies chroniques est une complication fréquente chez les patients diabétiques, et se traduit par des symptômes douloureux aux extrémités (hyperalgésie, allodynie) souvent accompagnés de sensations anormales (paresthésies et dysesthésies). Ces neuropathies diabétiques, douloureuses et handicapantes, sont causées par l'hyperglycémie chronique entraînant la destruction de la gaine de myéline entourant les nerfs, fragilisant les nerfs et impactant la conduction de l'influx nerveux. Le seul traitement actuel de la neuropathie diabétique consiste en l'amélioration de l'équilibre glycémique et l'utilisation de molécules antalgiques à large spectre. C'est pourquoi il est important et nécessaire de tester de nouvelles thérapeutiques visant à soulager spécifiquement ces douleurs liées notamment à un ensemble d'affections du système nerveux périphérique.

Le projet, d'une durée de deux ans, vise à tester l'efficacité de l'étifoxine (EFX) pour traiter ces symptômes douloureux dans les neuropathies diabétiques. L'EFX est un anxiolytique prescrit pour lutter contre l'anxiété réactionnelle chez l'homme. Utilisé chez l'animal il a montré des propriétés bénéfiques dans la réduction durable de symptômes douloureux neuropathiques et inflammatoires. L'EFX possède également des propriétés neurorégénératives et neuroprotectrices.

Le premier modèle de neuropathie diabétique choisi pour cette étude est celui reposant sur l'injection de streptozocine (STZ), un analogue structural du glucose, qui induit un diabète de type 1 insulino-dépendant. C'est le modèle le plus utilisé à travers le monde pour reproduire les symptômes douloureux dans les neuropathies diabétiques. Cette partie de l'étude nécessitera au total 112 souris mâles adultes, soit 8 groupes de 14, recevant un traitement préventif (4 groupes : traitement EFX avant l'injection de STZ) ou curatif (4 groupes : traitement EFX 4 semaines après l'injection de STZ).

Le deuxième modèle consistera en des souris génétiquement modifiées (db/db/-/), exprimant un diabète de type 2, non insulino-dépendant, contrairement au diabète de type 1 induit par la STZ. Il s'agit donc d'un modèle métabolique. Ici, seul l'effet curatif de l'étifoxine pourra être caractérisé, nécessitant 28 souris réparties en deux groupes. Cette deuxième partie ne sera abordée que si l'étude chez le modèle STZ démontre un bénéfice analgésique de l'étifoxine.

Un nombre de souris mâles égal à 140 est nécessaire pour réaliser l'étude. Le nombre d'animaux par lot a été estimé sur la base des analyses statistiques à réaliser et du seuil de significativité qu'elles requièrent. Des groupes de 14 animaux permettront d'objectiver des différences significatives supérieures à 20% lors de l'utilisation de tests non paramétriques.

Afin de tenir compte de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer), les animaux seront utilisés pour plusieurs tests comportementaux afin de réduire leur nombre au minimum. Les animaux sont hébergés en cage collective pendant toute la durée des expérimentations, dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères. Les cages sont enrichies avec du matériel de nidation (frisure), avec eau et nourriture ad libitum. Les souris db/db-/- seront hébergées dans des conditions en accord avec leur polydipsie et polyurie : litière très absorbante en rafle de maïs et biberons de grande taille. Le projet portant sur la mise en évidence des propriétés analgésiques d'une molécule, il est en revanche impossible à ce jour de se passer de sujets vivants dotés d'un cortex développé.

12133 Les cardiopathies ischémiques sont la première cause de mortalité dans le monde et représentent environ 9 millions de mort par an. Une étude clinique récente montre que la survie de ces patients n'a pas été améliorée entre 1998 et 2012, pour cause la complexité du développement de la cardiopathie et les nombreuses comorbidités qui lui

sont associées. Les comorbidités les plus fréquentes, retrouvées chez la moitié des patients ischémiques sont les troubles respiratoires du sommeil (TRS), ces patients montrent une mortalité accrue. Les patients atteints de TRS présentent des apnées répétées pendant le sommeil : on parle d'hypoxie intermittente (HI). Ainsi l'objectif est de comprendre les mécanismes délétères de l'HI sur la cardiopathie ischémique afin de prendre en charge spécifiquement et efficacement cette sous population de patient. Des études préliminaires suggèrent que l'HI est délétère sur la cardiopathie ischémique via l'induction d'une hyper activité du système nerveux autonome sympathique qui innerve le muscle cardiaque.

Afin 1) d'étudier le lien entre l'HI et l'hyper activité sympathique, et 2) de valider un modèle animal permettant d'étudier l'impact de cette hyper activité sur le post-infarctus, nous nous proposons de mesurer cette fonction chez le rat en utilisant pour cela un agent d'imagerie parfaitement validé et utilisé en pratique clinique. Ces mesures seront effectuées chez des rats normaux ou chez des rats présentant une dénervation cardiaque partielle et ces animaux auront été préalablement soumis à l'Hypoxie intermittente (HI) ou à la normoxie (N).

Au total 32 rats seront utilisés.

La présente demande ne concerne que la procédure d'évaluation de la fonction sympathique par imagerie. L'exposition des animaux à l'HI, ainsi que la dénervation partielle, sont réalisés par un autre établissement utilisateur.

Tout au long des études in vivo, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'étude du lien entre les activités nerveuse et cardiaque ne peut être conduite qu'in vivo, cependant nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Ces animaux seront hébergés par groupe, en cages avec enrichissement du milieu de vie. Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre sera réalisé sous anesthésie générale. Il est non invasif et n'entraînera en conséquence pas de douleur, souffrance ou angoisse.

12134 Le développement de nouveaux traitements de type Host Directed Therapy (HDT) visant à manipuler directement le système immunitaire de l'hôte afin de lui permettre d'éliminer une tumeur ou une infection aigue ou chronique est en plein essor. Ce type de traitement ne cible pas un pathogène ou un type de tumeurs en particulier mais un ou des mécanismes immunitaires, métaboliques, cellulaires de l'hôte qui peuvent être communs à différentes infections ou différentes tumeurs, qu'ils soient inhibiteurs ou activateurs de la réponse immune. Ces nouvelles thérapies comprennent entre autres le développement de protéines recombinantes (anticorps ou cytokines), de stimulateurs non spécifiques de l'immunité innée (par exemple de type agonistes de TLR), de petites molécules visant à interférer avec le métabolisme cellulaire par exemple.

Le laboratoire s'intéresse actuellement à ces nouvelles thérapies, notamment dans le cadre du sepsis dont l'origine peut être bactérienne, virale et/ou fongique et dans le but de rétablir la fonctionnalité du système immunitaire dans la phase d'immunosuppression post-sepsis telle qu'elle est décrite chez les patients. Pour ce faire, dans des études précliniques chez la souris, des molécules HDT formulées de façon particulière seront évaluées et comparées à des molécules HDT basées sur des protéines recombinantes. Le but est de comparer la pharmacocinétique des molécules HDT telles que nous les formulons à celle des protéines recombinantes, d'évaluer l'impact de la voie d'administration et de la dose sur cette pharmacocinétique et leurs effets biologiques au niveau de l'organisme.

Bien que le modèle murin ne reproduise pas complètement la complexité des mécanismes immunitaires chez l'homme, il reste néanmoins une bonne alternative. Il permet en effet d'évaluer in vivo la pharmacocinétique de molécules, leur distribution en fonction de la voie d'administration et d'évaluer leur activité biologique notamment sur les cellules du système immunitaire à l'échelle d'un organisme complet.

A l'heure actuelle, aucun modèle in vitro ne peut se substituer au modèle murin pour l'étude. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien-être de l'animal et limiter au maximum la souffrance subie par l'animal.

Un suivi des animaux sera effectué quelques heures après toutes les injections et tout au long de la procédure afin de déceler d'éventuels symptômes de mal être. Un anesthésique local sera appliqué aux animaux avant tout prélèvements sanguins.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit au minimum et optimisé sans compromettre les objectifs de ce dernier. Certains groupes contrôles pourront voir leur nombre d'animaux diminué en fonction des 1^{ers} résultats obtenus.

Ce projet inclura un maximum de 632 souris.

12135 La trisomie 21 (T21), aussi appelée Syndrome de Down (SD), est due à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Elle touche 1 nouveau-né pour 600-800 naissances et représente environ un tiers des déficiences intellectuelles chez les enfants d'âge scolaire. En plus d'un faciès caractéristique, les personnes atteintes du SD ont des difficultés d'apprentissage et de mémorisation provenant de défauts dans le développement et le fonctionnement du cerveau. Parmi les gènes candidats à l'apparition de ces symptômes, un gène présent sur le chromosome 21 humain et donc en 3 copies chez les sujets porteurs de la T21, est aujourd'hui une des cibles privilégiées pour le développement d'un traitement thérapeutique. Les études d'effet de doses de ce gène chez la souris ont démontré son implication dans le développement crânio-faciales et le développement et la maturation post natale du cerveau. En effet, les souris ayant une copie supplémentaire de ce gène d'intérêt présentent des malformations crânio-faciales ainsi qu'un retard de développement du cerveau entraînant une altération des capacités d'apprentissage et un déficit de la mémoire. Néanmoins, les études des déficiences intellectuelles restent assez limitées chez la souris. Le rat est un meilleur modèle pour l'analyse comportemental mais son utilisation pour l'étude du SD n'a pas été possible car cette espèce n'était pas manipulable génétiquement. Grâce au développement de nouveaux outils génétiques, nous avons pu créer un nouveau modèle de rat ayant trois copies du gène d'intérêt.

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

Dans ce projet, nous analyserons ce nouveau modèle dans des tâches comportementales pour lesquelles un déficit a déjà été observé chez les souris trisomiques pour ce gène (apprentissage, mémoire et activité circadienne), afin de valider ce modèle pour le SD. Ces tests concerneront le comportement exploratoire dans un nouvel environnement, différents types de mémoire et le rythme circadien.

RAFFINEMENT : L'ensemble des tests comportementaux entraîne très peu de stress ou souffrance pour les animaux. De plus, les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien permettant de

s'assurer de leur bien-être et de leur santé. Les animaux présentant des signes de douleur seront exclus des analyses et soignés ou euthanasiés selon leur état.

REDUCTION : Pour ces tests, des rats mâles seront utilisés, sexe référent de l'étude chez la souris, à partir de 8-10 semaines, âge équivalent au jeune adulte chez le rat. Afin de minimiser le nombre de rats utilisés, tous les tests seront réalisés avec les mêmes animaux.

Les femelles produites seront euthanasiées et utilisées pour l'analyse crânio-faciale. Comme cette analyse ne fait pas l'objet d'une procédure expérimentale, le nombre de rats utilisés ne tient pas compte des femelles.

Les tests statistiques utilisés seront soit le test de Student pour des groupes non appariés avec comparaison de moyennes entre 2 groupes à une constante spécifiée, ici 50% correspondant à une performance au hasard, soit le test d'ANOVA 2 entrées. Entre 12 à 16 animaux par groupe sont nécessaires pour avoir une puissance statistique suffisante permettant de déterminer si une différence existe entre les deux groupes. Ces expériences nécessiteront donc 32 rats au maximum (16 individus mâles par génotype).

12136 CD31 est une protéine exprimée à la surface des cellules du sang et des vaisseaux. Elle a différentes fonctions selon les cellules qui l'expriment, et peut notamment délivrer un signal de survie aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et bloquer l'activation des cellules du système immunitaire. Le rôle du CD31 a été étudié dans différentes pathologies inflammatoires (athérosclérose, anévrisme de l'aorte abdominale, arthrite rhumatoïde), et il a été montré que le CD31 possède des propriétés anti-inflammatoires et antiplaquettaires, en faisant une cible intéressante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cependant, afin de développer des outils thérapeutiques, il est nécessaire de mieux comprendre le rôle du CD31 dans les différentes cellules qui l'expriment, ainsi que son mécanisme d'action.

Les neutrophiles sont des cellules sanguines qui jouent un rôle essentiel comme première ligne de défense contre les pathogènes, et expriment le CD31. Ils jouent un rôle au niveau des plaies infectées et doivent pour cela traverser la barrière des cellules endothéliales pour passer du sang au tissu. Nous souhaitons mieux comprendre le rôle du CD31 dans le recrutement des neutrophiles aux sites d'inflammation.

Dans ce but, nous allons étudier l'interaction des neutrophiles et des cellules endothéliales dans deux modèles d'inflammation *in vivo* chez la souris. La première approche permettra d'étudier la dynamique des interactions entre neutrophiles et cellules endothéliales dans les veines du mésentère par de la microscopie *in vivo*. Une anesthésie générale avec analgésie est induite, la cavité abdominale est ouverte afin d'exposer les veines proches de l'intestin, et y observer les neutrophiles par microscopie. L'ensemble de la procédure dure 45 minutes puis les souris sont euthanasiées avant leur réveil. La seconde approche permettra d'étudier le recrutement des neutrophiles dans le péritoine dans un modèle de péritonite stérile, qui consiste à injecter dans le péritoine des souris une molécule inflammatoire non infectieuse. Les souris sont euthanasiées 2 à 4 heures plus tard pour compter les neutrophiles dans le péritoine et le sang. Dans les deux procédures, nous injecterons aux souris par voie intraveineuse ou intrapéritonéale des molécules permettant d'activer ou d'inhiber les voies de signalisation induites par le CD31. Afin d'étudier le rôle du CD31, nous utiliserons pour ces deux expériences cinq modèles de souris transgéniques n'exprimant pas, ou exprimant des formes mutées du CD31, dans toutes les cellules, ou dans les neutrophiles uniquement. Ces souris ont des phénotypes non dommageables.

Ce projet est fondé sur la règle des 3R. Remplacement : nous avons réalisé des expériences *in vitro* qui montrent que le CD31 est impliqué dans les interactions entre les neutrophiles et les cellules endothéliales. Cependant, les interactions entre neutrophiles et cellules endothéliales se font normalement en condition de flux sanguin, en présence de nombreux autres acteurs potentiels, et nous devons donc mener des expériences complémentaires sur des organismes vivants, ayant un système immunitaire proche de l'homme, comme les souris, afin de confirmer nos résultats. Réduction : Afin de minimiser le nombre d'animaux, une étude statistique a été réalisée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires. Ce projet va nécessiter l'utilisation de 171 souris. De

plus, nous allons utiliser soit des animaux issus de même portées, soit de fond génétique pur, afin de limiter la variabilité entre individus et donc le nombre d'animaux nécessaires. Raffinement : les souris sont élevées sans isolement, avec enrichissement. Des points limites ont été établis afin d'intégrer au maximum la préconisation des 3R. Au cours de la microscopie in vivo, en cas de signes de réveil, les souris recevront une nouvelle dose d'anesthésie. Si les signes de réveil persistent, les animaux seront mis à mort. Les procédures d'imagerie sont réalisées sous anesthésie générale avec confort thermique. Les prélèvements sanguins sont réalisés sous anesthésie générale. Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre le rôle du CD31, et de mettre au point de nouveaux traitements ciblant le CD31 dans des maladies comme l'athérosclérose, les anévrismes de l'aorte abdominale, ou l'arthrite rhumatoïde.

12137 Les cancers localisés dans les muqueuses comme le cancer du poumon ou de la sphère oto-rhino-laryngée/ORL sont des cancers très résistants aux traitements.

L'immunothérapie consiste à activer le système immunitaire, et plus particulièrement les lymphocytes T qui jouent un rôle crucial dans l'élimination des cellules tumorales.

Des travaux récents ont montré que dans le cas de tumeurs muqueuses, la vaccination administrée par voie muqueuse (exemple : intranasale) protégeait plus efficacement que les voies d'administration conventionnelles (sous-cutanée, intramusculaire, intradermique). Des travaux ont démontré que la vaccination intranasale induit la surexpression d'une molécule particulière sur les lymphocytes T anti-tumoraux. Cette molécule est connue pour avoir un rôle important dans la migration et/ou rétention de ces lymphocytes sur le site muqueux.

Notre projet a pour but d'étudier le rôle de cette molécule dans la réponse anti-tumorale après vaccination par voie intranasale dans des modèles orthotopiques de tumeurs muqueuses.

Seule l'expérimentation in vivo chez la souris, intégrant l'ensemble du système immunitaire, nous permet d'étudier et de reproduire fidèlement la réponse immunitaire et le microenvironnement tumoral muqueux.

Nous étudierons le rôle de cette molécule en utilisant des souris déficientes pour cette molécule et des souris contrôles.

Dans un 1er temps, les souris déficientes et leurs contrôles seront vaccinées par voie intranasale et intramusculaire, et les réponses immunitaires étudiées. Dans un 2nd temps, afin d'obtenir des modèles orthotopiques de tumeurs muqueuses, les souris déficientes et leur contrôles, seront greffées avec des cellules tumorales dans la langue ou la joue, et seront ensuite vaccinées par voie intranasale. Nous évaluerons ainsi l'impact de l'expression de cette molécule sur l'efficacité de la réponse anti-tumorale. Et enfin nous évaluerons si la modulation de cette molécule peut augmenter l'efficacité d'un vaccin administré par voie intranasale. Les procédures d'induction de tumeur et de vaccinations seront effectuées sous anesthésie générale pour éviter toute sensation de douleur ou d'inconfort. L'analyse des réponses immunitaires sera réalisée sur les prélèvements de sang et d'organes en post mortem.

Cette étude nécessitera un total de 390 souris pour une période de 5 ans.

Toutes les procédures expérimentales ont été pensées et élaborées dans le respect des 3R pour obtenir des résultats statistiquement satisfaisants avec un nombre réduit d'animaux. Certains paramètres expérimentaux (stratégies vaccinales, modèles tumoraux, nombre de cellules à implanter, nombres d'animaux suffisants pour des études statistiques) ont déjà été déterminés par des études précédentes et publiées. Chaque procédure expérimentale sera optimisée afin de récupérer le maximum d'échantillons possible sur le même animal pour réaliser toutes les analyses.

Dans les modèles de tumeurs nous nous attacherons à réduire au maximum la douleur des animaux. L'implantation des tumeurs et la vaccination intranasale seront réalisées sur des souris anesthésiées, et les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et suivis régulièrement. Pour chaque procédure, des points limites et des critères d'arrêt sont définis ce qui permettra de limiter au maximum la souffrance animale et entraînera l'euthanasie anticipée de l'animal.

A terme, pour le traitement de cancers localisés dans les muqueuses, cette molécule pourrait être une nouvelle piste thérapeutique dans le développement d'immunothérapies administrées par voie intra-nasale.

12138 La gestion des animaleries modernes dans un espace contraint nécessite une réduction des élevages et un contrôle des statuts sanitaires. Afin de diminuer au maximum le nombre d'animaux respirants des lignées de souris génétiquement modifiées aux seuls animaux indispensables aux procédures expérimentales, nous allons développer au sein de notre animalerie les techniques de cryoconservation de lignées par congélation d'embryons et de reviviscence de lignées par revitalisation d'embryons congelés. Ces techniques répondent à la règle des 3Rs « réduction / raffinement / remplacement » en proposant une alternative à l'élevage pour la conservation des lignées de souris et en permettant la maintenance d'un statut sanitaire SOPF compatible avec la possibilité d'échanges d'animaux (embryons congelés en paillettes) entre différentes animaleries. Avec ce même objectif, nous allons développer la décontamination de lignées par transfert d'embryons afin de pouvoir intégrer des animaux de statut sanitaire non compatible pour l'entrée dans notre animalerie SOPF.

Pour leur bien-être, les animaux seront hébergés en groupe et disposeront d'enrichissements (rondelles de copeaux de peuplier compactés, coton pour la nidification, refuges Cellodome) dans les cages.

Dans le souci d'éviter et de réduire toute douleur ou souffrance animale, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie et sous analgésie. Une surveillance quotidienne sera effectuée, elle permettra le contrôle post-opératoire et de détecter d'éventuels signes de souffrance dont l'évaluation à l'aide d'une grille de score conduira à la mise en place d'une médication adaptée.

Pour réaliser ce projet et pour répondre aux besoins de notre centre de recherche, nous utiliserons au total 3050 animaux sur 5 ans.

12139 Le rumen est le grand pré estomac des ruminants dans lequel ont lieu les fermentations qui apportent la majorité des nutriments énergétiques et protéiques au ruminant. La détermination des contenus en fermentation dans le rumen constitue une information intéressante pour mieux comprendre les dynamiques d'ingestion et de digestion chez les ruminants. Pour déterminer le volume du contenu stomacal, seules des techniques de marqueurs liquides ou une vidange du rumen sont disponibles mais uniquement sur des animaux préparés physiologiquement. Le développement d'un outil d'acquisition de la morphologie en 3 dimensions permet aujourd'hui d'estimer des volumes de tout ou partie d'un animal. Ce dispositif très novateur permet l'acquisition en quelques secondes par un ensemble de caméras sur un portique mobile de la forme complète en 3 dimensions d'un animal aussi gros qu'un bovin. En se focalisant sur la zone du rumen, nous faisons l'hypothèse que l'estimation du volume de tout ou partie de l'abdomen, largement occupé par le rumen, peut constituer un bon estimateur des volumes de contenu du rumen. Cet essai, réalisé en station expérimentale, vise à essayer de calibrer cette technique d'imagerie de forme par un ensemble de mesures ponctuelles au cours de l'année 2019 sur un groupe de 40 vaches, afin d'estimer les quantités de contenus du rumen en utilisant des méthodes de référence sur des vaches laitières à différents stades physiologiques et avec plusieurs régimes alimentaires classiquement utilisés en élevages. Ces animaux sont gardés en vie et réintègrent le troupeau expérimental par la suite. Deux procédures sont testées : le drenchage qui consiste à administrer une quantité de liquide donnée dans le rumen de la vache, et la vidange gastrique, qui consiste à vider ce dernier. Pour chaque méthode, il est nécessaire de disposer au minimum de 20 animaux pour disposer d'un nombre de données suffisant pour envisager une publication permettant de faire reconnaître l'intérêt de l'imagerie 3D.

Cet essai met en œuvre le principe des 3R, à savoir:

-1. Remplacer : à ce jour, ce type d'approche n'a jamais été réalisé sur vaches laitières. Il n'est pas possible de se passer cet essai sur les animaux, car nous ne disposons pas de méthodes alternatives.

-2. Réduire : Avec une variation allant de poids vif allant de 450 à plus de 900 kg chez la vache laitière, Il est impératif de disposer d'au minimum 2 par tranche de 50 kg de poids vif, soit 20 animaux au final par méthode testée. En cas d'erreur, ne disposer que d'une seule par tranche de 50 kg conduirait à une absence de donnée.

- 3. Raffiner : les animaux seront manipulés par un personnel formé, maîtrisant les techniques employées et ayant suivi une formation à l'expérimentation animale. Les relations quotidiennes entre ces animaux et le personnel, les conditions d'accueil et de contention optimale, régulièrement contrôlées au sein de la station expérimentale, permettent de limiter les situations stressantes.

12140 Dans les conditions habituelles d'élevage, les porcelets ne sont pas totalement matures aux plans digestif et immunitaire lors du sevrage, ce qui pose notamment des troubles au niveau digestif. Pendant longtemps les antibiotiques ont été utilisés pour préserver la santé des porcelets lors de cette période de fragilité importante. Face à l'émergence des risques d'antibiorésistance, des solutions alternatives sont recherchées, notamment par la voie nutritionnelle.

L'apport d'antioxydants dans l'alimentation est connu pour être une voie d'amélioration de la résistance des animaux aux stress. L'objectif de l'étude est de tester l'incorporation dans l'aliment d'une micro algue, riche en antioxydants, pour renforcer les défenses du porcelet et faciliter la phase de sevrage. Deux modes d'apport sont testés, via l'alimentation de la truie en fin de gestation et en lactation, et/ou via l'aliment du porcelet sevré. Les effets des régimes seront évalués par la composition en caroténoïdes du colostrum des truies, les performances zootechniques, l'observation des signes cliniques des porcelets ainsi que sur différents paramètres sanguins indicateurs de la santé des porcelets sevrés. Cet essai implique l'utilisation de 48 truies et leur portée, réparties en 2 groupes expérimentaux (1 par régime) de 24. Pour chaque groupe, la moitié des porcelets recevra en post sevrage un aliment témoin ou un aliment avec micro algues. En post-sevrage, l'essai portera ainsi sur 576 porcelets répartis en 4 groupes expérimentaux, soit 18 cases de 8 ou 9 animaux par régime. Les truies seront étudiées pendant les 4 dernières semaines de gestation et les 4 semaines de lactation, les porcelets de la naissance à la fin du post-sevrage (9 semaines d'âge).

Ce type d'étude nécessite d'être réalisé sur l'espèce porcine et sur animaux (Remplacement). Les conditions d'élevage sont contrôlées de façon à satisfaire les besoins de confort des truies et des porcelets en termes de logement, d'alimentation, d'abreuvement et conditions d'ambiance (Raffinement). Les effectifs sont considérés comme nécessaires pour une exploitation statistique des données à partir d'expériences menées dans des conditions similaires (Réduction). Le nombre total d'animaux est de 624. Les prélèvements de sang seront réalisés sur un nombre réduit de porcelets (Réduction) par du personnel expérimenté. Les autres mesures seront non invasives (pesées des animaux et des aliments consommés).

12141 D'après l'OMS, l'arthrose affecte plus de 70 millions de personnes en Europe et représente en terme de Santé Publique un coût de plus de 80 milliards d'Euros. La recherche concernant les biomatériaux utilisables dans cette affection vise à développer des substituts à même de remplacer le cartilage articulaire lésé ou de se substituer au liquide synovial. Le but de notre étude est de tester un gel injecté dans le grasset de Lapin afin de vérifier ses effets locaux comme substitut du liquide synovial.

Ce modèle animal nous permettra de vérifier l'aspect bénéfique de cette injection intra-articulaire dans une articulation sollicitée mécaniquement.

L'application de la règle des 3R sera effectuée comme suit :

- Les biomatériaux implantés font l'objet d'une étude préalable in vitro avant d'être implantés chez l'animal afin de réaliser une première sélection.
- Le nombre d'animaux est réduit au maximum grâce à l'utilisation de statistiques non paramétriques et en veillant à réduire la variabilité.
- La réalisation de ces injections dans les conditions d'asepsie d'un bloc opératoire et par des chirurgiens vétérinaires expérimentés permet de réduire le traumatisme chirurgical et les

complications septiques. Outre la gestion de l'analgésie pré et postopératoire, l'état général et clinique des animaux est surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier et par un vétérinaire pour estimer une éventuelle gêne ou douleur. Cette évaluation journalière permet la mise en place, si nécessaire, d'un traitement le plus précocement possible. Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu.

Sur la période de 5 ans, 60 lapins seront utilisés.

12142 Le thon rouge (*Thunnus thynnus*) a été fortement surexploité lors des deux dernières décennies et en 2007 un plan de reconstitution a été mis en œuvre. Depuis, la situation du stock Méditerranéen s'est substantiellement améliorée, mais de grandes étapes pour la gestion et la conservation de ce stock, ainsi que des espèces de grands pélagiques en général (e.g. porte-épées et thonidés), restent à être franchies. En particulier, les liens entre l'environnement physique (e.g. le climat) et les processus biologiques (migrations, reproduction, nutrition) sont aujourd'hui mal connus pour ces espèces à très large aire de répartition.

Les données nécessaires pour combler ce manque, données physiologiques et environnementales, sont simples mais les contraintes inhérentes au milieu marin rendent complexe leur collecte. Les marques archives électroniques à transmission satellite sont des instruments attachés au poisson qui enregistrent des informations sur leur environnement (température, lumière, pression). Ces marques permettent de contourner certains problèmes, mais leur technologie demeure limitante. Un projet multidisciplinaire est en cours, qui propose d'utiliser les technologies à la pointe de la recherche actuelle pour développer une nouvelle génération de marques électroniques. Cette marque sera moins chère, à durée de vie plus longue et, pour la première fois, collectera aussi des informations sur la physiologie des individus.

La nouvelle marque électronique à transmission satellite embarquera un capteur permettant de mesurer par bioimpédance différents aspects de la physiologie du poisson, en particulier son taux de gras. Les données enregistrées par cette marque devraient permettre de décrire où et quand se déroulent les étapes essentielles du cycle de vie du thon rouge (et d'autres grands pélagiques). La réussite de ce projet constituera ainsi un pas important tant pour la recherche fondamentale que pour la recherche appliquée.

Dans le cadre de ce projet, plusieurs aspects du marquage seront abordés:

Amélioration du système d'ancrage actuel des marques électroniques (pour en réduire notamment le caractère intrusif)

Tests de déploiement en milieu naturel

Mise au point du capteur physiologique

Mise au point des électrodes implantées (intramusculaire ou sous-cutané) du capteur

Plusieurs opérations de marquage sont prévues au cours du projet afin de tester les différents prototypes réalisés sur les thons rouges (2017 N=35, 2018 N=70, 2019 N=200).

Étant donnée la complexité du projet, ce dossier ne concerne que la partie marquage du projet, les autres parties feront l'objet de soumissions de dossiers supplémentaires. Par exemple, des expérimentations sont prévues pour la mise au point du capteur et un dossier de demande d'autorisation sera déposé pour celles-ci.

Les protocoles suivent la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner):

Remplacer: Une partie des expérimentations, inhérente à la mise au point du capteur, pourra être réalisée sur des espèces d'aquaculture. Cependant, le modèle thon rouge en milieu naturel devra nécessairement être utilisé, car (i) l'objectif étant d'améliorer les connaissances sur l'écologie de cette espèce dans son environnement naturel et (ii) les modèles in vitro ne sont pas disponibles.

Réduire: Le nombre d'individus utilisés est optimisé afin de permettre de réaliser des tests statistiques appropriés aux différents objectifs du projet. Ainsi en 2017, il sera nécessaire de valider le premier prototype de la marque sur les aspects de transmission et d'acquisition des données. En 2018 un nombre d'individus plus grand sera marqué pour pouvoir permettre de tester en plus des

systèmes d'ancrage et de largage. Enfin, en 2019 le programme de marquage permettra de suivre un banc d'individus (200 poissons).

Raffiner: Le protocole de marquage a été défini en tirant profit de l'expérience de nombreux chercheurs dans le domaine et en tenant compte des pratiques vétérinaires concernant les espèces aquacoles. Ce protocole permettra de limiter au maximum la souffrance et le stress des animaux grâce à des temps de pêche réduits (<10mn), une sortie de l'eau facilitée par une civière, une intubation permettant la ventilation du poisson, la couverture des yeux ainsi qu'un matelas de réception, permettant de garder le poisson hors de l'eau moins d'une minute trente et de le relâcher dans les meilleures conditions possibles. Enfin, un système de double ancrage permettra d'éviter au poisson les blessures occasionnées par les mouvements latéraux de la marque.

12143 Les mélanocytes sont des cellules spécialisées dans la production de pigments et colonisent de nombreux tissus au sein de l'organisme comme la peau et les follicules pileux. Les mélanomes cutanés sont des tumeurs provenant de la transformation de ces mélanocytes épidermiques ou folliculaires. Le mélanome est l'un des cancers les plus agressifs, connu pour sa grande résistance à la plupart des traitements actuels (chimio- et radiothérapie) et les patients atteints, dont le nombre est en augmentation croissante, ont une durée de survie moyenne d'un an après diagnostic. En effet, compte tenu de l'évolution rapide du mélanome et de sa capacité importante à former des métastases, un diagnostic précoce et une ablation chirurgicale des tumeurs primaires en phase de croissance dans les couches superficielles de la peau reste le moyen le plus efficace de soigner cette pathologie. Une fois que la tumeur s'est engagée dans une phase de croissance verticale (invasion), elle peut atteindre le système sanguin ou lymphatique propice à la dispersion des métastases dans l'organisme et le mélanome devient difficile à soigner.

Pour permettre de développer de nouvelles thérapies ciblées contre cette pathologie, il est nécessaire de comprendre les mécanismes d'apparition et de développement des tumeurs et les propriétés des métastases. Pour cela, nous nous intéressons aux caractéristiques d'un acteur jouant un rôle dans le développement du mélanome. Cette approche ouvrira la voie à une étude chez la souris.

L'ensemble du projet devrait nécessiter environ 120 souris (incompressible du fait de la nécessité de résultats statistiques et de la prise en compte de l'ensemble des contrôles). La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction : le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement : les procédures expérimentales susceptibles d'entraîner une douleur, une souffrance ou une angoisse pour l'animal sont toutes accompagnées d'un traitement analgésique. Un animal n'est pas gardé en vie à l'issue d'une procédure s'il est susceptible de continuer à éprouver une douleur, souffrance ou angoisse qui ne peut pas être soulagée. ; 3) remplacement : les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de processus biologiques complexes comme la formation de tumeurs de mélanome. Le rongeur est donc l'une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.

12144 Pour la reproduction sexuée, la méiose est une étape clé pour permettre la formation de gamètes (ovocytes ou spermatozoïdes) avec un bon nombre de chromosomes. Des défauts lors du déroulement de la méiose peuvent être cause de stérilité ou bien d'anomalies du nombre de chromosomes comme dans le cas de la trisomie 21 (causée par la présence d'un chromosome 21 surnuméraire) ou du syndrome de Turner (causée par l'absence d'un chromosome sexuel X ou Y).

Des études menées chez l'homme ont identifié des mutations ponctuelles dans notre gène d'intérêt chez des groupes de patients hommes et femmes présentant une stérilité. Chez la levure de boulanger, ce gène joue un rôle important au cours de la méiose. Par ailleurs une étude récente chez la souris a montré que l'élimination totale de ce gène entraîne la stérilité. L'ensemble de ces résultats suggère que le produit de ce gène est nécessaire au bon déroulement de la méiose et à la fertilité. Toutefois aucune étude n'a encore démontré que les mutations ponctuelles retrouvées chez les patients stériles sont bien la cause de leur stérilité. Ce projet vise à le déterminer.

Afin de limiter au maximum nos études sur l'animal, nous avons développé différents systèmes utilisant notamment la levure de boulanger qui est un excellent organisme modèle pour l'étude de la méiose. Nos résultats montrent que des mutations de notre gène d'intérêt équivalentes à celles retrouvées chez les individus stériles ont un impact sur le déroulement de la méiose chez la levure. Malheureusement, il n'existe à ce jour aucun modèle cellulaire qui permettrait de confirmer ces résultats dans des cellules humaines en culture. Donc bien que nos résultats obtenus chez la levure suggèrent que ces mutations puissent être responsables de la stérilité chez l'homme, cette hypothèse a besoin d'être confirmée chez un organisme modèle mammifère comme la souris. Notre projet vise à créer et caractériser une lignée de souris génétiquement modifiée porteuse d'une mutation de ce gène retrouvée chez des individus stériles.

Pour ce projet nous serons conduits à utiliser un maximum de 280 souris. Il est ajusté au plus bas mais compatible avec l'obtention de résultats fiables. Nous n'utiliserons dans ce projet aucune procédure qui fasse souffrir l'animal. Il n'est pas attendu de phénotype dommageable autre qu'une éventuelle stérilité des souris porteuses de la mutation. Toutefois, en cas d'apparition d'un phénotype dommageable, toutes les précautions seront prises pour réduire au maximum la souffrance et le stress des souris conformément aux règles de l'éthique.

12145 Le saumon, espèce abondante et symbolique du Rhin a disparu du fleuve dans les années 1950 par suite des modifications de l'habitat et de la dégradation de la qualité de l'eau. Pour y remédier, un programme de réintroduction et d'étude du saumon a été mis en place.

Les poissons migrateurs sont protégés, leur gestion est encadrée par le Code de l'Environnement selon un plan de gestion visant à restaurer des populations pérennes de poissons migrateurs. Malgré le retour du saumon en Alsace depuis 1995, la stratégie de repeuplement n'a pas été évaluée scientifiquement. Le présent projet, soutenu par l'Etat, permet à la fois d'évaluer le repeuplement, la dévalaison et la reproduction naturelle.

Un programme génétique est mis en place sur l'ensemble du Rhin afin d'évaluer les stratégies de repeuplement (choix des rivières de réintroduction, des souches génétiques et des stades de juvéniles). L'identité génétique de chaque adulte servant en pisciculture à la production des juvéniles réintroduits doit être connue. Les croisements génétiques réalisés au cours des hivers 2017 à 2019 donneront lieu à la constitution de lots permettant de tracer chaque type de réintroduction entre 2018 et 2020.

Un test de paternité, réalisé au stade tacon (juvénile en rivière) capturés sur leur lieu de vie, c'est à dire dans la rivière de réintroduction ou plus en aval au stade smolt lors de la dévalaison (1 à 2 ans plus tard ; stade d'adaptation physiologique à la vie marine) ainsi que sur les adultes de retour (jusqu'à 5 ans après la réintroduction), permettra d'apprécier les repeuplements les plus efficaces. La reproduction naturelle en rivière sera estimée par la recapture d'individus non tracés génétiquement.

Pour l'analyse génétique, un fragment de tissu sera prélevé à l'extrémité d'une nageoire. En fonction du lieu et du stade de vie ciblé, différentes techniques permettront la capture des individus.

En complément, pour quantifier le nombre de smolts quittant le bassin, les captures lors de la dévalaison donneront lieu à une évaluation de type Capture-Marquage-Recapture (CMR). La CMR consiste à identifier individuellement des poissons, par la pose d'un transpondeur, à les relâcher en amont du piège afin de probabiliser une nouvelle capture ou détection sur une série d'antennes.

Il n'est pas possible de remplacer le modèle animal pour évaluer la stratégie de réintroduction. L'effectif utilisé est réduit à son minimum pour avoir une puissance statistique satisfaisante. Afin de le réduire encore, à chaque fois que cela sera possible, nous utiliserons le même animal (génétique + CMR). 2 100 saumons doivent être échantillonnés génétiquement (1500 smolts, 400 tacons, 200 adultes). 1500 smolts seront marqués par transpondeur (2019-2021) dont 900 ayant déjà été prélevés génétiquement. Au total un maximum de 2 700 saumons sera utilisé (2019-2023). Afin de limiter le stress, les animaux seront anesthésiés, les manipulations seront de courte durée, sans captivité prolongée et le réveil post opératoire sera assuré avant de les relâcher dans le milieu naturel (Raffinement).

12146 Les altérations des milieux aquatiques par les efflorescences de cyanobactéries sont susceptibles de modifier le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Les préjudices associés à ces efflorescences comprennent : des perturbations de la chaîne trophique, une diminution de la pénétration de la lumière dans l'eau, une diminution de l'oxygène dissous disponible, mais également la production de métabolites secondaires potentiellement bioactifs et parfois toxiques pour certains organismes qui y sont exposés. En effet, de nombreux genres de cyanobactéries sont susceptibles de produire et/ou de relarguer dans le milieu aquatique des molécules aux propriétés éminemment, ou potentiellement, bioactives, délétères, voir toxiques. Si les effets toxicologiques (sensus stricto) de ces micro-organismes et de leurs métabolites sont connus sur certaines cellules ou tissus de vertébrés, notamment téléostéens, on ignore leur impact sur le microbiote procaryote associé (i.e. la communauté microbienne associée). Des travaux menés ces dernières années ont montré que le microbiote, localisé à l'interface entre un organisme et le milieu extérieur, peut jouer un rôle important dans la physiologie de l'hôte, mais aussi dans de nombreux traits chez les Vertébrés, parmi lesquels la résistance aux pathogènes.

Le présent projet propose d'étudier l'effet de l'exposition à des doses représentatives des conditions environnementales de métabolites de cyanobactéries sur le microbiote bactérien associé à la peau, aux branchies et au tube digestif d'un téléostéen modèle, le médaka. A ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur le compartiment microbien. On ignore s'il est altéré, et s'il pourrait jouer un rôle lors d'événements d'expositions aux cyanobactéries. L'objectif est ici de tester l'hypothèse d'une modification du microbiote lors d'expositions à des métabolites produits par certaines souches de cyanobactéries.

Dans le cadre de l'étude de l'interaction du microbiome associé à un organisme, seules les expérimentations réalisées sur organismes vivants sont susceptibles de retracer la complexité des interactions avec les micro-organismes associés. Ce travail, se positionne dans le cadre d'une réflexion sur la réduction des organismes utilisés à des fins expérimentales et cherche ainsi à optimiser le nombre d'organismes tout en assurant une qualité suffisante d'informations générées permettant de mener un raisonnement scientifique, étayant les hypothèses à tester. Les expérimentations seront effectuées avec un nombre de réplicats judicieux et suffisants (n=3) pour permettre d'ingérer les aléas dus à la variabilité biologique expérimentales, tous en respectant la règle des 3R, notamment quant à la réduction des effectifs employés et le raffinement en travaillant les conditions d'élevage non-stressantes recommandées par l'OCDE (guideline 240) à des doses environnementales d'exposition situées proches des NOEC (non-observed effect concentration) afin de limiter les potentiels effets toxicologiques. Les points limites sont définis. Si un des points limites concernant signe de stress ou de comportement est atteint, ces animaux seront le cas échéant, isolés, puis si aucune amélioration n'est rapidement observée, euthanasiés. Ce sont au total 252 poissons qui seront exposés pendant 28 jours à différentes conditions d'enrichissement de l'eau en cyanobactéries ou en extraits de biomasses cyanobactériennes. Chaque individu sera ensuite disséqué après sacrifice et l'ADN sera extrait de chaque tissu (peau, branchie, tube digestif). En parallèle, l'ADN sera extrait de l'eau issue des bacs de chaque traitement, ainsi que de la nourriture utilisée pour les poissons (contrôles). La composition des communautés bactériennes sera étudiée par le séquençage haut débit d'une zone hypervariable du gène codant l'ARNr 16S à partir des extraits d'ADN. Les séquences obtenues permettront d'identifier la diversité des unités taxinomique opérationnelles (OTUs) présentes, et la composition des communautés associées aux différents tissus et traitements sera comparée à l'aide d'analyses statistiques uni- et multivariées. Une analyse quantitative de la colonisation bactérienne des différents tissus échantillonnés sera réalisée par hybridation in situ (FISH) sur coupes histologique, et des paramètres physiologiques seront examinées chez les animaux : index hépato-somatique, dommages cellulaires hépatiques, poids... Les facteurs testés seront le type d'exposition, le type de tissu et la variabilité entre les réplicats.

12147 Le tryptophane (Trp) est un acide aminé essentiel nécessaire à la biosynthèse des protéines et un précurseur biochimique de métabolites qui ont des effets majeurs sur la physiologie des mammifères. Dans le tractus gastro-intestinal, le métabolisme du Trp peut suivre trois voies

principales, qui sont toutes sous le contrôle du microbiote intestinal. Les produits finaux de ces voies jouent un rôle clé dans la modulation de la réponse immunitaire, des fonctions intestinales et du comportement. Plusieurs maladies qui impliquent le microbiote intestinal dans leur pathogenèse sont également impactées par des métabolites du Trp, comme le syndrome métabolique, la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique. Cela suggère que l'effet du microbiote dans ces maladies pourrait être, au moins partiellement, médié par l'altération du métabolisme du Trp. Ces pathologies sont de plus en plus prévalentes dans les pays occidentaux et impactent fortement leur population, il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous avons récemment observé qu'une dysfonction du métabolisme du Trp par le microbiote intestinal est impliquée dans la pathogenèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (syndrome métabolique induit par un régime riche en graisse et modèle de colite induite par le Dextran Sulfate Sodium ou DSS) et des données préliminaires suggèrent un rôle potentiel dans d'autres maladies humaines (e.g. la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique et des syndromes métaboliques comme le diabète de type II). Des travaux de l'équipe ont mis en évidence l'importance de certains composants du microbiote intestinal dans le contrôle des trois voies du métabolisme du Trp dans l'intestin. Les objectifs pour ce projet sont, (i) comprendre le rôle des composants du microbiote intestinal dans le contrôle des 3 voies du métabolisme du Trp dans l'intestin, (ii) déchiffrer l'équilibre entre les 3 voies pour évaluer le potentiel d'une modulation comme cible thérapeutique, (iii) décrypter et comprendre les mécanismes sous-jacents à ces modifications dans un contexte pathologique et enfin (iv) d'évaluer la pertinence de ces phénomènes chez des patients humains.

Ce projet se déroulera sur 5 ans. Afin de répondre aux objectifs posés, nous utiliserons plusieurs modèles pour étudier différentes pathologies observées chez l'homme telles que des inflammations intestinales, ou des perturbations du microbiote provoquées soit par des traitements antibiotiques, soit par un régime alimentaire riche ou pauvre en tryptophane, ou encore riche en graisse (western diet). Ces modèles seront appliqués soit à des souris témoins, soit à des souris invalidées pour un ou plusieurs gènes des 3 voies du métabolisme du tryptophane, soit enfin à des souris invalidées pour le gène Card9 (Caspase recruitment domain 9) chez lesquelles nous avons récemment montré que le microbiote était défaillant pour le métabolisme du Trp. La compréhension des mécanismes impliquera l'utilisation de souris témoins, mais également de souris déficientes, pour des gènes clés essentiels à la réponse immunitaire de l'hôte face à la maladie, tels que le gène de l'IL-22, GPR35 ou de Rag2, ce dernier invalidant toute l'immunité adaptative.

L'essentiel des prélèvements (sang, tissus, contenus intestinaux) sera fait post mortem à l'exception des fèces. Afin d'appliquer au mieux la règle des 3R, nous avons prévu dans nos projets scientifiques d'utiliser des expérimentations in vitro sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires préalablement à l'utilisation d'animaux, ce qui permet d'en réduire le nombre. Nos études imposent le modèle animal pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations in vitro. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle in vitro récapitulant tous les paramètres du tube digestif. Nos groupes de souris seront réduits à 10 animaux par traitement testé. Le nombre de lignées de souris étant relativement élevé pour décrire et comprendre les voies et mécanismes du métabolisme du Trp (10 lignées génétiquement modifiées) dans ce projet, nous utiliserons un maximum de 756 souris par an sur 5 ans, soit 3780. En effet, nous allons utiliser trois modèles différents pour cette étude, chaque expérience sera reproduite 3 fois pour garantir la qualité statistique des données et des souris non traitées seront également indispensables à la compréhension des différents résultats obtenus (variabilité basale de certaines cellules et protéines en fonction du génotype de la souris).

Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulées...). Nous avons veillé à enrichir le milieu de vie par l'ajout de feuille de cellulose dans les cages et d'un abri prévu à cet effet. Le suivi attentif et régulier des animaux sera réalisé afin de suivre l'évolution de la colite et du syndrome métabolique induits par les protocoles expérimentaux.

12148 La sclérose en plaque (SEP) est une maladie inflammatoire chronique du système nerveux central (SNC) et représente la cause la plus fréquente du déficit neurologique acquis chez les jeunes adultes. Cette maladie est caractérisée par une destruction de la myéline (la gaine isolante permettant une communication rapide entre les neurones) qui entraîne une disparition progressive des neurones avec pour conséquence un déficit neurologique irréversible. Il est donc important de stimuler la réparation de la myéline pour minimiser les effets de la maladie.

Les lésions provoquées par la SEP se retrouvent dans les fibres nerveuses du cerveau et de la moelle épinière. La réparation des lésions par l'administration ciblée de molécules thérapeutiques représente donc un défi majeur pour les médecins.

Cette nouvelle approche thérapeutique est mise en application par une technique qui guiderait les molécules d'intérêt thérapeutique jusqu'au niveau de la lésion. Dans notre projet, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont modifiées *ex vivo* à l'aide d'un vecteur lentiviral incluant le gène thérapeutique Sémaphorine 3F. Ces CSH ont la capacité à se différencier *in vivo* en cellules microgliales pouvant sécréter la molécule Sémaphorine 3F et migrer vers les lésions de la moelle épinière. Dès lors, les molécules Sémaphorine 3F, ainsi libérées, pourront recruter des cellules progénitrices des oligodendrocytes (CPOs) qui à terme répareront les lésions par un mécanisme de remyélinisation. Le but étant de favoriser les processus de réparation par les précurseurs (CPOs), par l'induction d'une surexpression de la molécule Sémaphorine 3F.

Cette étude ne peut être réalisée que sur un organisme entier vivant car aucun dispositif *in vitro* ou modèle *in silico* ne peut reproduire la complexité des mécanismes neuronaux. Le modèle rongeur a été choisi et permettra d'évaluer le potentiel de cette thérapie pour la réparation de la myéline.

Le projet prévoit d'utiliser 480 rongeurs, nés et élevés dans des établissements agréés. Leur nombre a été réduit à un minimum nécessaire pour permettre l'interprétation des résultats par des tests statistiques.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe de vétérinaire. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus, et dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages, enrichies de modules permettant de diversifier leurs activités, et sont observés au quotidien par une équipe en charge de leurs soins.

12149 L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (chaperone-mediated autophagy ou CMA) – encore largement méconnue- est l'une des voies majeures de l'autophagie qui se caractérise par la dégradation de protéines portant dans leurs séquences un motif protéique particulier. Cette reconnaissance des protéines et leur dégradation se fait au niveau des lysosomes qui sont des organites cellulaires présents dans le cytoplasme cellulaire. Cependant, de récentes études ont démontré qu'elle était induite lors de stress (notamment nutritif et oxydatif) et qu'un dérèglement de cette fonction cellulaire entraîne des perturbations importantes du métabolisme intermédiaire (révélant un pan totalement ignoré du contrôle métabolique) et serait à l'origine de certaines maladies neurodégénératives et de cancers.

Selon l'idée actuellement admise, le CMA n'existerait que chez les mammifères ou les oiseaux, qui seraient les seuls à exprimer la protéine LAMP2A, indispensable au fonctionnement de cette fonction cellulaire. Or, en tirant profit de la base de données transcriptomique Phylofish (dédiée à une vingtaine d'espèces de poissons), nous avons pu mettre en évidence l'existence de cette protéine chez un certain nombre d'espèces de poissons dont le medaka (*Oryzias latipes*).

Dans ce contexte, notre projet a pour objectif d'invalider le gène *lamp2a* chez le medaka afin de déterminer précisément le rôle physiologique de cette protéine chez cette espèce (et potentiellement l'existence de CMA chez les poissons). Il pourrait ainsi ouvrir ce domaine de recherche à d'autres espèces et faire progresser notre connaissance du rôle du CMA encore peu connu. Enfin, les poissons générés constitueront un modèle d'étude pertinent pour une meilleure compréhension de certaines pathologies liées au CMA.

Le nombre d'animaux nécessaires au projet est de 100 poissons.

Ce projet bien qu'utilisant la transgénèse se conforme entièrement à la règle des « 3R » :

-Remplacer : L'alternative in vitro ne saurait remplacer les modifications physiologiques induites dans l'ensemble de l'organisme d'un animal vivant. En outre, les poissons générés constitueront un modèle d'étude pertinent pour une meilleure compréhension globale des perturbations métaboliques liées à la perte du CMA à l'échelle d'un organisme.

-Réduire : Le nombre d'animaux est adapté et minimisé afin de permettre la génération d'une lignée transgénique stable. Une fois cette lignée établie, un stock de 25 poissons sera maintenu dans nos installations.

-Raffiner : Afin de réduire autant que possible la souffrance et le stress des animaux et améliorer leur bien-être, plusieurs mesures sont prises allant de la mise en place de conditions d'élevage adaptées, à l'emploi d'une procédure d'euthanasie agréée par le comité d'éthique. En outre, nous serons attentifs aux effets engendrés par l'invalidation du gène *lamp2a* et procéderons, le cas échéant, à l'euthanasie des poissons avant l'apparition de symptômes graves ou de signes de stress.

12150 Le traitement des pertes de substance mandibulaires segmentaires demeure un problème de santé publique. Ces pertes de substances osseuses segmentaires résultent de la résection d'un fragment osseux avec interruption de la continuité mandibulaire ; il s'agit de défaut dont l'étendue est telle qu'aucune réparation osseuse spontanée n'est possible. En France, la principale cause des pertes de substances segmentaire de la mandibule est la chirurgie d'exérèse carcinologique. 500 000 nouveaux cas de cancers des Voies Aéro-digestives Supérieure sont diagnostiqués chaque année dans le monde. En France, ces cancers représentent 15 000 nouveaux cas par an chez l'homme et 2 000 nouveaux cas par an chez la femme. Si une résection interruptrice de la mandibule est nécessaire, une reconstruction mandibulaire est envisagée pour faciliter la mastication, maintenir la statique des muscles du plancher buccal et de la langue, faciliter la déglutition et conserver l'esthétique. La reconstruction repose le plus souvent sur le lambeau libre de fibula, mais ce lambeau présente l'inconvénient du temps opératoire et d'un nombre d'échec non négligeable. Plus récemment, le traitement des pertes de substances osseuses segmentaires mandibulaires par la technique de la membrane induite a été étudié. Il s'agit d'une technique en 2 temps combinant l'induction d'une membrane induite in situ et une greffe osseuse. Mais des études précédentes menées au sein de l'unité ont montré que la membrane induite présentait des limites liées à son absence de pouvoir ostéoinducteur (absence de cellules ostéoprogénitrices et faible quantité de facteurs de croissance) et à la nécessité d'un deuxième temps opératoire.

La membrane amniotique humaine (MAH) est la partie la plus interne du placenta. Cette membrane pourrait être une alternative à la membrane induite en cancérologie du fait de ses propriétés biologiques et mécaniques. Il s'agit d'un tissu abondant dont l'obtention est simple car il s'agit d'un déchet opératoire. De plus, la MAH est peu immunogène et son utilisation chez l'animal a déjà été approuvée, donc son implantation chez l'animal ne risque pas de rejet de la greffe. En plus, la MAH a des propriétés anti-tumorales. Il a été montré que la MAH fraîche pouvait se substituer au périoste et favoriser la régénération osseuse chez le lapin. Pour diverses raisons, la MAH ne peut être utilisée fraîche en pratique clinique. Ainsi plusieurs méthodes de conservation de la MAH ont été développées. Les travaux menés dans l'unité ont démontré que la membrane amniotique cryopréservée améliorerait la régénération osseuse de défauts de calvaria de souris. La MAH lyophilisée a été utilisée chez l'homme en parodontologie associée à des substituts osseux pour traiter des furcations de classe II, et une étude rapporte une réparation osseuse précoce de défauts fémoraux de rats grâce à de la MAH décellularisée. Cependant, il n'existe pas d'étude à ce jour permettant de sélectionner une méthode de préservation de référence de la MAH pour la régénération osseuse.

Pour étudier les conditions optimales d'utilisation de la membrane amniotique pour la régénération osseuse, l'équipe de recherche souhaite comparer les propriétés ostéogéniques de la membrane amniotique fraîche, cryopréservée, lyophilisée, et décellularisée et lyophilisée chez la souris.

Pour cela, la régénération osseuse de défaut diaphysaire fémoral sera évaluée chez 45 souris (1 défaut par diaphyse, soit n=90). Le défaut sera soit laissé vide soit recouvert par l'un des 4 types de membrane amniotique. Remplacement : Il n'existe pas de modèle in vitro permettant d'étudier la réparation osseuse dans ce contexte. Réduction : ces expériences sont conçues pour limiter le nombre d'animaux à 6 par temps et pour chacune des 5 conditions expérimentales, en utilisant des tailles de groupes basées sur des travaux antérieurs et permettant des comparaisons statistiques. Raffinement : une méthode d'analgésie des animaux en pré- et post-opératoire sera réalisée par injection intrapéritonéale de 0.1mg/kg de Buprénorphine 30 minutes avant intervention, ainsi que le lendemain de l'intervention. Après l'intervention, les souris seront replacées en fratrie avec des conditions d'hébergement et un milieu d'enrichissement adaptés, favorables au bien-être de l'animal (coton pour nidification, litière avec copeaux de peuplier, tuyaux pour jouer).

12151 La maladie de Marek (MD) est associée à un lymphome T, un cancer mortel chez la poule. Cette maladie hautement contagieuse est due à un alpha herpes virus du genre Mardivirus, le virus de la maladie de Marek (MDV). Bien que la vaccination soit largement utilisée depuis les années 1970, cette maladie reste une maladie d'importance économique, chez la poule au niveau mondial. La persistance de l'infection est attribuée au fait que les vaccins préviennent la formation des tumeurs, mais n'empêchent pas la réplication du virus et son excrétion virale dans l'environnement. Aussi trouver des vaccins qui bloqueraient la maladie mais aussi l'excrétion virale est l'un des objectifs prioritaires de la recherche actuelle sur le MDV.

De façon intéressante, l'herpes virus du dindon (HVT), virus apathogène utilisé pour vacciner contre la MD est aussi excrété dans le milieu extérieur, et cela de façon importante. De plus, ce virus est de plus en plus utilisé comme virus plateforme. Cela consiste à insérer dans le génome HVT un transgène codant un antigène protecteur d'un autre virus aviaire afin de vacciner à la fois contre la maladie de Marek et contre une autre maladie. Dans ce contexte, l'objectif du projet proposé est d'étudier la dynamique d'excrétion de virus HVT mutants afin d'évaluer l'impact de ces mutations sur la persistance virale dans la peau comparativement au virus parental. Les moyens mis en œuvre pour respecter la règle des 3R seront les suivants:

> Remplacement: Il n'existe à ce jour aucune méthode in vitro pour appréhender l'excrétion et la persistance du HVT dans la peau de poule ; et donc de remplacer l'expérimentation in vivo.

> Réduction: Afin de réduire le nombre de poules, plusieurs paramètres biologiques seront suivis en parallèle. De plus, des calculs statistiques ont été effectués pour estimer le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à la réalisation de cette expérience.

> Raffinement: les animaux seront vaccinés par un virus apathogène largement utilisé mondialement qui n'altère pas le bien être des poules. Le milieu de vie des animaux sera enrichi (jouets suspendus). Ce projet nécessitera l'utilisation de 40 poules.

12152 Avec plus de 650 millions de personnes touchées dans le monde en 2016, l'obésité est devenue un enjeu de santé publique avec les problèmes sanitaires et économiques qu'elle entraîne. L'obésité est corrélée à l'apparition d'autres troubles métaboliques tel que le diabète de type 2. Le diabète se développe lorsque les cellules β -pancréatiques n'arrivent plus à produire suffisamment d'insuline pour maintenir le taux de sucres stable dans le sang (la glycémie). L'insuline étant la seule hormone qui diminue la glycémie, des défauts dans sa sécrétion ou son action dans les tissus engendrent un grand nombre de problèmes. Nous savons aussi que la consommation d'un régime gras et sucré entraîne des altérations dans une région du cerveau, l'hypothalamus, qui contrôle le métabolisme et qui peut influencer la sécrétion d'insuline et son action dans l'organisme. Il est donc déterminant de mieux comprendre comment notre organisme répond à la surcharge calorique, trouver de potentielles cibles thérapeutiques et ainsi élaborer de nouveaux traitements pour l'obésité et le diabète.

Ces dernières années, le système endocannabinoïde (SEC) a été reconnu comme cible thérapeutique potentielle pour combattre l'obésité de par sa capacité à réguler la prise alimentaire et la balance énergétique. Lors de l'obésité, le SEC est suractivé. Le récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB1) est le récepteur aux cannabinoïdes le plus étudié. Il est exprimé dans un grand

nombre d'organes. On le trouve au niveau hypothalamique, mais aussi dans les cellules β -pancréatiques, où il régule la sécrétion d'insuline ainsi que la glycémie. Le rôle déterminant de CB1 dans la régulation du métabolisme en fait une cible préférentielle dans le traitement pharmaceutique de l'obésité. Cependant, les fonctions physiologiques de CB1 ne sont pas seulement reliées aux types cellulaires dans lesquels il est exprimé mais aussi à sa localisation intracellulaire. En effet, CB1 est présent sur la membrane plasmique des cellules (pmCB1) mais aussi au niveau des mitochondries (mtCB1) qui constituent la source d'énergie des cellules. Sachant que la mitochondrie a un rôle crucial dans les neurones et pour la sécrétion d'insuline, il est déterminant d'étudier le rôle des mtCB1 dans l'hypothalamus et la cellule β -pancréatique et son impact sur la balance énergétique.

Nous allons utiliser un modèle animal qui a une mutation qui limite l'adressage de CB1 vers la mitochondrie, mais la quantité et la fonction de pmCB1 ne sont pas modifiées. Ceci est possible suite au troncage des 22 premiers acides aminés de CB1 (DN22CB1). Grâce à ce modèle, nous pourrions manipuler l'expression de mtCB1 dans certains types de neurones et les cellules β -pancréatiques pour étudier son rôle dans la balance énergétique et le métabolisme du glucose.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 980 souris, car ce projet sera réalisé pendant 5 ans.

Au cours de notre étude, nous porterons une attention particulière à la mise en œuvre des principes éthiques fondamentaux (principe des 3Rs : Remplacement, Réduction et Raffinement) :

Remplacement : Le modèle animal présentant un défaut de localisation mitochondrial de CB1 est nécessaire pour étudier le rôle de ce récepteur dans le métabolisme énergétique. Les études in vitro ne peuvent cependant pas remplacer l'utilisation d'animaux, étant donné la nécessité d'évaluer plusieurs paramètres in vivo.

Réduction : Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre d'animaux utilisés afin d'éviter des répétitions inutiles. Des tests de puissance ont été réalisés afin de déterminer le plus petit nombre d'animaux par groupe nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement : Afin de définir les dommages et contraintes subis par les animaux, nous avons établi une grille qui permet de surveiller leur bien-être général grâce à un système de score par points.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et françaises, dans le respect des nouveaux standards de soin et de bien-être des animaux, appliqués dans notre équipe de recherche.

12153 Les patients hypertendus et diabétiques présentent des lésions des microvaisseaux qui causent la dégénérescence de certains organes comme les yeux ou les reins. L'hypertension artérielle est la plus fréquente des affections cardiovasculaires, touchant environ 20 % de la population adulte. L'hypertension artérielle est d'ailleurs la deuxième cause de mise sous dialyse en Europe, derrière le diabète.

Nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées pour étudier les mécanismes de survie et de mort des cellules vasculaires rénales au cours de l'hypertension artérielle et du diabète. Nous cherchons ainsi à valider in vivo des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études in vitro. En premier lieu, nous induirons une hypertension artérielle chez les souris et nous analyserons la fonction cardiaque et rénale en réalisant des prélèvements sanguins, urinaires et par échographie. L'hypertension artérielle sera induite par l'implantation sous-cutanée d'une mini-pompe osmotique délivrant de l'angiotensine 2 associée à un régime riche en sel. La pression artérielle sera également mesurée tout au long de la procédure. Après 6 semaines maximum, les souris seront euthanasiées pour prélèvement d'organes afin d'étudier les lésions vasculaires.

Nous traiterons également des souris à la streptozotocine afin de les rendre diabétiques et nous analyserons la fonction cardiaque et rénale en réalisant des prélèvements sanguins, urinaires et par échographie. Après 10 semaines de diabète, les souris seront euthanasiées pour prélèvement d'organes afin d'étudier les lésions vasculaires.

Dans certains cas, nous délivrerons aux souris des molécules que nous avons identifiées comme cibles thérapeutiques potentielles, par l'implantation sous-cutanée de mini-pompes osmotiques.

L'hypertension artérielle et le diabète sont des maladies complexes et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible le microenvironnement hypertensif, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans les lésions vasculaires rénales. La souris est un modèle de choix car elle développe des complications vasculaires hypertensives et diabétiques proches de celles de l'homme.

De plus, nous tirerons parti de la transgénèse, c'est à dire le fait de pouvoir modifier les gènes des souris, afin d'étudier les cibles identifiées in vitro.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et une grille de souffrance a été établie, permettant d'évaluer finement la souffrance des animaux et de pouvoir délivrer des analgésiques en cas de besoin. Les procédures douloureuses ou stressantes seront réalisées sous anesthésie générale gazeuse en présence d'analgésiques. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans. Le nombre de souris utilisées sera de maximum 2200.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des lésions microvasculaires au cours du diabète. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments ciblant les voies mises en causes, permettant ainsi de prévenir ou freiner le développement des maladies vasculaires chez les patients hypertendus ou diabétiques.

12154 Nous disposons au laboratoire d'un modèle murin d'épilepsie néonatale. Nous voulons savoir s'il existe des anomalies de développement des acquisitions neurosensorielles précoces dans ce modèle. Pour cela, nous étudieront le développement des animaux entre la naissance (P0) et P15 selon un protocole standardisé qui permet d'observer les différentes étapes du développement post-natal précoce. Ce travail nous permettra de savoir si ces animaux présentent des anomalies du neurodéveloppement avant que les crises d'épilepsie ne soient observées (ces anomalies surviennent en moyenne entre P25 et P30 dans ce modèle). Obtenir ces informations est important dans l'optique d'un développement thérapeutique futur car on ne sait pas si ces épilepsies induisent une anomalie neurologique après que les crises soient apparues ou si de telles anomalies existent avant l'âge des premières crises. Il s'agit d'un projet principalement descriptif (au niveau de l'organisme entier et des tissus cérébraux), basé sur le nombre minimal d'animaux (36) permettant d'espérer un résultat statistiquement significatif. Les animaux sont hébergés en groupe (au minimum 2 animaux), en présence d'un dôme leur permettant de s'y cacher, avec accès non restreint à la boisson et à la nourriture, afin de limiter leur stress au maximum. Nous avons organisé ce projet de façon à respecter la règle des 3R en réduisant au maximum le nombre d'animaux utilisés par expérience, en raffinant la méthodologie. Nous n'avons pas pu remplacer le modèle animal utilisé par un autre car les réponses attendues sont celles de l'organisme entier

12155 Les tiques constituent un risque majeur pour la santé humaine et animale en transmettant la plus grande variété d'agents pathogènes (bactéries, parasites et virus). Parmi les 170 virus transmis par les tiques, peu d'entre eux sont étudiés au sein de leur modèle arthropode. En raison de leur cycle de réplication rapide et de leur grande taille de population, les virus transmis par les arthropodes existent sous forme de populations de variants/souches avec des génomes étroitement proches, mais pas identiques appelés quasi-espèces qui leur permettent de s'adapter très rapidement aux nouveaux environnements. Néanmoins, une sélection efficace semble dominer l'évolution génétique de ces virus entraînant une stabilité de leur génome qui pourrait être due au fait que ces virus sont obligés d'alterner entre un hôte vertébré et un hôte invertébré pour se maintenir dans la nature. Malgré tout, ces virus gardent la capacité de générer des souches capables d'exploiter de nouveaux environnements et d'induire des émergences comme le démontre les épidémies dues au virus ZIKA en 2015. Ces dernières années, des virus connus, transmis par les tiques, ont émergés

dans de nouveaux territoires (Encéphalite à tique (TBE), Louping ill, Powassan, Deer tick, et la Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo (CCHF) tandis que de nouveaux virus, parfois mortels, ont été découverts (Bourbon USA 2014, Heartland USA 2012, Virus SFTSV Chine 2011). Afin de mieux comprendre ces phénomènes d'émergence, nous nous proposons d'évaluer la variabilité génétique et l'adaptation de 4 virus (Colorado tick fever (CTF) (Coltivirus), Kemerovo (Orbivirus), TBE et Louping ill (Flavivirus) transmis par les tiques à leur hôte invertébré et vertébré. Ce travail devrait nous permettre de répondre aux questions suivantes : (1) l'alternance d'hôte, comparativement au passage en continu dans le même hôte, contraint-elle l'évolution des virus transmis par les tiques ? ; (2) la variabilité génétique de ces virus est-elle différente lors de passages in vitro versus in vivo ? A plus long terme, ce travail nous permettra d'identifier les gènes qui semblent plus contraints au niveau évolutif et qui pourraient donc constituer de potentielles cibles antivirales. Les protocoles ont été conçus dans les règles des 3 R avec tout d'abord une réduction au maximum de la douleur : Il n'y a pas de souffrance particulière attendue suite au gorgement des tiques, seule la pose de la capsule peut générer un inconfort, de plus selon le virus utilisé il peut y avoir des signes neurologiques qui se développent chez les souris, dans ce cas les souris seront mises à mort dès qu'une paralysie sera constatée. En ce qui concerne le remplacement, ces expériences nécessitent l'utilisation de souris pour comparer les résultats obtenus in vitro à ceux que l'on obtiendra in vivo et permettront de statuer sur la nécessité d'utiliser des modèles in vivo pour d'autres virus d'intérêt. Au total 5616 souris au maximum seront utilisées à travers 4 procédures. Le nombre de souris sera potentiellement très fortement réduit si les expérimentations se déroulent correctement dès le premier essai, et si moins de souches de virus sont disponibles par rapport aux 3 souhaitées par virus.

12156 Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) est une pathologie de la grossesse dont la fréquence et la gravité sont largement sous-estimées. Souvent associé à la prématurité qu'il aggrave, le RCIU, qui peut toucher jusqu'à 10 à 15 % des naissances, est grevé d'une augmentation importante de la mortalité in utero et néonatale. Chez les enfants survivants, le RCIU peut induire des pathologies et handicaps graves, touchant pratiquement tous les systèmes organiques, dont le système respiratoire (détresses respiratoires néonatales), la plupart des organes vitaux (rein, cœur, foie) et, tout particulièrement, la sphère neurologique.

L'inflammation cérébrale joue un rôle majeur dans l'apparition de lésions cérébrales associées au RCIU ainsi qu'en cas de naissance prématurée ou de stress gestationnel important. L'expression de cette inflammation cérébrale passe par l'activation des cellules microgliales qui représentent les cellules immunitaires résidentes du cerveau. L'augmentation de l'inflammation cérébrale postnatale provoque un retard de maturation des oligodendrocytes, cellules cérébrales responsable de la production de myéline qui est cruciale pour la conduction nerveuse. Ce déficit en myéline semble être au cœur des retards neuro-développementaux observés chez ces enfants.

Les RCIU comme les stress gestationnels engendrent une diminution de la production centrale d'Ocytocine (OXT), une hormone d'origine hypothalamique particulièrement importante dans la période périnatale aussi bien pour le bon développement cérébral que pour l'établissement des relations précoces entre la mère et sa progéniture. En expérimentation animale, l'OXT a également la capacité de réguler l'activation microgliale et présente des effets anti-inflammatoires. En effet, les agonistes des récepteurs à l'OXT sont capables de limiter l'activation microgliale lorsqu'ils sont administrés à l'animal en période postnatale.

L'action in-vivo observée ne permet pas de prouver une action directe sur la microglie de l'OXT ou de ses agonistes chez les animaux en période périnatale. L'objectif de ce projet sera donc d'observer les conséquences de l'inactivation génétique de l'expression microgliale des récepteurs à l'OXT sur l'activation microgliale en conditions basales et stimulées, ainsi que les conséquences de cette inactivation sur le développement cérébral.

Pour cela nous désirons utiliser une souris dont l'expression de l'enzyme Cre recombinase (Cre) est restreinte à la microglie. Nous souhaitons croiser ces souris Cre homozygotes avec des souris OXTR flox homozygotes afin d'invalider l'expression de l'OXTR spécifiquement dans les cellules microgliales.

Nous pourrions détailler le rôle important joué par l'OXT dans le contrôle de l'activité microgliale durant les phases précoces de la vie foétale et périnatale en observant chez ces souris si les effets anti-inflammatoires centraux de l'OXT ou de ses agonistes passent bien par une action directe sur la microglie. Nous désirons étudier le cerveau de ces souriceaux face à un challenge inflammatoire modéré et sous l'effet d'un agoniste de l'ocytocine : la carbétocine (procédure 1 : injection i.p. d'interleukine 1 beta (il1b) et de carbétocine à P1 et P2). Nous utiliserons plusieurs temps d'euthanasie : P1, P2, P4, P10, P21 et P30. Nous prélèverons le cerveau qui sera utilisé pour des analyses de biologie moléculaire (qPCR) et d'immunohistologie. Nous étudierons également la connectivité cérébrale par de l'imagerie sur animal anesthésié (procédure 2, durée : 45 minutes environ). Aucun prélèvement ne sera fait avant l'euthanasie des animaux. Un groupe d'animaux contrôle (injection i.p. de solvant au lieu des molécules actives) servira de comparaison et sera euthanasié aux mêmes points de temps.

Les mesures mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales sont :

- lors de l'imagerie : anesthésie et analgésie par injection intrapéritonéale, utilisation d'une sonde corporelle reliée à un tapis chauffant afin de contrôler la température de l'animal. Contrôle du rythme respiratoire. Une seringue contenant le mélange anesthésique est laissée en intrapéritonéale sur l'animal pour prévoir le maintien de l'anesthésie si la procédure dure plus longtemps que prévue (au delà de 30 min).

- lors des injections intrapéritonéales : mesure quotidienne du poids des souriceaux, vérification de leur aspect (couleur, peau). En raison de la manipulation régulière des souriceaux, ceux-ci sont remis à leur mère avec précaution : ils sont auparavant recouverts d'un peu de litière pour se ré imprégner de l'odeur de leur mère. L'expérimentateur vérifiera que les mères réunissent de nouveau leurs petits dans son nid et ne les rejettent pas.

Des critères d'arrêt ont été définis (points limites: si le souriceau ne prend pas de poids d'un jour sur l'autre et pas de visibilité de la poche à lait).

Nombre d'animaux estimés : il est prévu d'utiliser 288 souriceaux. Nous désirons mener le projet sur 5 ans.

Afin de suivre la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) :

- Désirant étudier le développement cérébral général, il nous paraît impossible de remplacer les expérimentations in vivo de cette étude par des expérimentations alternatives.

- Pour chaque time point d'étude, afin de réduire le nombre d'animaux, nous prévoyons de prélever le cerveau et d'utiliser un hémisphère pour faire des études moléculaire (qPCR) et un hémisphère pour faire des études immunohistologiques. Une seule expérimentation sera donc nécessaire pour l'ensemble de nos études pour chaque time point.

Les animaux adultes seront réutilisés pour de nouveaux accouplements.

- Afin de diminuer le nombre d'injections intrapéritonéales, nous injecterons l'IL-1b et la carbétocine en même temps, au sein d'un même mélange.

Les animaux seront suivis tout au long de leur vie par le personnel qualifié de l'animalerie. La surveillance se fait chaque jour, y compris le weekend : relevé de poids et de l'aspect des animaux.

12157 Les tiques – et notamment *Ixodes ricinus*, l'espèce la plus commune en Europe - constituent les plus importants vecteurs de maladies vectorielles humaines dans l'hémisphère nord.

Le présent projet vise à réaliser le gorgement d'*I. ricinus* sur lapin afin de réaliser des études sur la bactérie endosymbiotique *Midichloria mitochondrii* d'une part et sur les neurorécepteurs des tiques d'autre part.

Présente dans 100% des femelles de populations naturelles d'*I. ricinus*, la bactérie endosymbiotique *M. mitochondrii* est localisée majoritairement au niveau des ovaires de tiques. Ces caractéristiques suggèrent que cette bactérie pourrait être un symbiote obligatoire des tiques, permettant ainsi d'envisager d'utiliser la lutte antisymbiotique pour lutter contre ces acariens. Différents protocoles d'injection d'antibiotiques dans les tiques seront mis en place afin de produire des tiques indemnes

de *Midichloria* (et leur témoin en possédant) et par comparaison déterminer le rôle de cette bactérie dans le développement des tiques.

Parallèlement, nous menons un programme de recherche visant à développer de nouvelles molécules acaricides plus spécifiques des tiques et n'ayant donc pas d'effets négatifs non-intentionnels sur les autres arthropodes (notamment les insectes) au sein des agro-écosystèmes. Pour cela, nous voulons décrire la totalité des gènes de neurotransmetteurs exprimés dans les neurones de tiques et déterminer ceux qui sont les plus divergents de ceux observés chez les insectes. Les tiques femelles produites à partir du gorgement de nymphes seront disséquées pour extraire leur synganglion (le cerveau des tiques) et réaliser des études *in vivo* sur les neurotransmetteurs qu'ils contiennent.

Les tiques étant des ectoparasites hématophages obligatoires, elles doivent absolument réaliser un repas sanguin à chaque stade afin de poursuivre leur développement, nécessitant donc le recours à des animaux vivants pour leur gorgement. Des techniques de gorgement sur gorgueur artificiel existent mais elles nécessitent l'utilisation d'antibiotiques pour empêcher la contamination des gorgeurs par des microorganismes, utilisation qui n'est pas compatible avec nos études nécessitant l'utilisation d'un témoin sans antibiotique. Par ailleurs, le gorgement artificiel est moins efficace (taux de succès du gorgement et poids des femelles gorgées inférieurs) et plus long, nécessitant finalement un volume important de sang pour amener les tiques jusqu'à réplétion.

Enfin, le gorgement des femelles adultes d'*I. ricinus* ne peut pas être réalisé sur des animaux de plus petite taille comme les rongeurs et nécessite donc l'utilisation d'un animal de taille supérieure comme le lapin. Nous avons prévu de raffiner le protocole de gorgement sur lapin en déposant les tiques non plus sur les oreilles mais sur le dos du lapin – moins sensible -. Ce protocole permet aussi d'éviter d'utiliser des collerettes (source de gènes pour l'alimentation, irritation au niveau du cou...).

18 lapins seront nécessaires pour réaliser les gorgements qui produiront l'ensemble des tiques nécessaires aux différentes investigations. Ce nombre est réduit au maximum tout en permettant de disposer du matériel biologique en quantité suffisante pour faire les tests prévus sur les tiques produites (quantification des *Midichloria* par qPCR, mesures de traits d'histoire de vie des tiques avec ou sans symbiote) et procéder aux extractions de synganglions de tiques (utilisés pour étudier les neurorécepteurs présents dans ces neurones).

Les tiques injectant des substances analgésiques et anti-inflammatoires lors de leur pique, il n'est pas nécessaire d'utiliser de médicaments supplémentaires.

Les manipulations des lapins se dérouleront dans le strict respect du bien-être des animaux. A cet effet, l'hébergement est assuré dans des cages individuelles conformément à la réglementation en vigueur. Toute maladie concomitante apparaissant pendant l'inclusion dans l'étude fera l'objet de soins et traitements adaptés. L'échec aux traitements conventionnels et l'impact de la maladie sur les résultats de l'étude seront évalués comme point limite. Les animaux ont accès librement aux granulés spéciaux pour lapins et à l'eau de boisson (*ad libitum*). L'enrichissement du milieu se fait par des jouets (blocs de foin compacté et boule métallique) et une tablette surélevée permettant aux lapins de passer au-dessus ou de s'abriter en dessous par des ouvertures adaptées évitant la luminosité environnante en cas de besoin.

12158 La dénutrition cancéreuse, appelée cachexie cancéreuse, est un syndrome multifactoriel auquel sont exposés les patients souffrant d'un cancer. Il conduit à une perte massive de tissu adipeux blanc et de muscle squelettique, affectant de façon importante la réponse aux traitements, la qualité de vie et l'autonomie des malades. 80% des patients porteurs d'un cancer pancréatique sont dénutris au moment du diagnostic. Cette dénutrition est un élément majeur à prendre en compte dans la prise en charge des patients car elle réduit significativement leur survie. Les mécanismes impliqués dans ce phénomène ne sont pas tous élucidés, expliquant l'échec des prises en charge visant à restaurer l'état nutritionnel des patients. C'est pourquoi, il est indispensable de les identifier pour élaborer des stratégies visant à améliorer leur quotidien et leur survie.

En dépit de son rôle dans la régulation des métabolismes (énergétique, drogues), l'implication du foie dans la cachexie cancéreuse a été peu explorée et n'est donc pas clairement définie et certainement sous-estimée. De nombreuses observations concourent, en effet, à proposer son rôle dans la dénutrition cancéreuse et à s'interroger sur les altérations métaboliques hépatiques. Le premier objectif de ce projet est donc d'identifier les dérégulations des métabolismes hépatiques dans un modèle murin de cancer du pancréas. Ces dérégulations pourraient être contrecarrées par l'activité physique (AP), connue pour moduler physiologiquement le métabolisme hépatique. Ainsi, notre second objectif est d'évaluer l'impact d'un programme d'AP sur la dénutrition cancéreuse et de déterminer son impact sur le foie.

Nous réaliserons une étude pilote servant de pré-manipulation donc l'objectif est de définir les caractéristiques du modèle, notamment la cinétique d'apparition de la cachexie. Ensuite nous continuerons avec le projet expérimental pour répondre aux questions scientifiques posées: évaluer et déterminer dans nos conditions expérimentales, l'impact d'un programme d'AP régulière sur le foie et la cachexie cancéreuse. Pour l'étude pilote nous allons utiliser 5 groupes de 5 souris (2 types cellulaires et 2 endroits d'inoculation+ 1 contrôle). Puis, à partir des résultats obtenus dans le groupe pilote, nous aurons 3 groupes (T1, T2 et T3) dans lesquels il y aura 4 sous-groupes identiques : cancer (n=10), cancer + AP (n=10), contrôle (n=10), contrôle nutritionnel (n=10). Les trois groupes seront sacrifiés à la fin de l'expérimentation pour poursuivre les études au niveau moléculaire. Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R.

Remplacement: ce modèle expérimental in vivo est nécessaire pour comprendre le rôle du foie dans l'apparition de la cachexie cancéreuse, ce qui ne peut être remplacé par un modèle in vitro.

Raffinement: les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animal. L'hébergement se fait dans des cages munies de jouets compatibles afin de minimiser le stress induit par l'hébergement. Le raffinement est complété par une surveillance journalière des animaux pour s'assurer que les conditions de bien-être sont respectées. En cas de souffrance constatée des animaux, toutes les mesures nécessaires pour réduire la souffrance seront mises en place (anesthésie, analgésie et/ou sortie du protocole).

Réduction: Le nombre d'animaux a été choisi en fonction du nombre nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable pour valider les données obtenues à la fin de la procédure. Dans notre étude, 145 souris mâles (25 pour l'étude pilote et 120 pour le projet) seront utilisées pour répondre à ces exigences statistiques.

12159 Les macrophages sinusoidaux des ganglions lymphatiques sont des cellules très importantes dans la défense contre des infections virales, comme les virus transmis par les moustiques (Dengue, Zika, Chikungunya). Toute information sur le processus biologique de la différenciation de ces macrophages pourrait apporter des nouvelles pistes pour combattre plus efficacement ces maladies infectieuses. Nous avons montré que les cellules endothéliales lymphatiques activées par la molécule RANK contrôlent leur mise en place. L'objectif de ce projet est de savoir si les macrophages sont renouvelés à partir des précurseurs sanguins et si les cellules endothéliales activées par RANK sont impliquées dans le recrutement de ces cellules. Si ceci était le cas, des procédures thérapeutiques pourraient être imaginées afin de renforcer la population macrophages.

Remplacement : Afin de mieux comprendre cette régulation biologique, nous utiliserons un modèle animal (souris) qui ne peut être remplacé à ce jour, car il n'existe pas de méthodologie qui reproduit la complexité cellulaire du ganglion lymphatique. Le nombre total des souris pour ce projet est de 120 animaux.

Raffinement : Dans le souci de raffinement, les animaux sont hébergés en groupe dans un environnement enrichi comprenant des tunnels en plastique et reçoivent de l'anesthésie et des soins appropriés. Nous évitons des interventions de longue durée et appliquons des points limites établis préalablement afin d'évaluer, d'éviter et de soulager la souffrance. Ainsi, les injections sont effectuées sur des souris sous anesthésie générale et par un personnel compétent.

Réduction : Nous utiliserons les connaissances rapportées dans la littérature et acquises par les laboratoires, notamment sur les techniques permettant de localiser et d'analyser les macrophages

afin de réduire le nombre de souris. Le nombre d'animaux est le minimum permettant une analyse de nos données par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni.

12160 Le Diplôme Universitaire de Chirurgie Expérimentale est une formation permettant aux candidats (titulaire d'une formation en expérimentation animale niveau conception et réalisation de projets ou niveau application des procédures) d'acquérir les différentes techniques chirurgicales de base afin de répondre à une exigence réglementaire (selon le décret n°2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques) concernant la pratique de la chirurgie sur animaux.

L'enseignement se compose de 4 modules :

Module 1 : Aspects réglementaires, juridiques et éthiques de la chirurgie expérimentale

- Considération éthique : Bien-être et souffrance des animaux
- Réglementation relative à l'expérimentation animale. Application de la directive européenne 2010/63/UE du parlement européen relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, du décret n°2013-118 du 1er février 2013. Les apports de la nouvelle réglementation.
- Procédures d'expertise éthique en Matière d'Expérimentation Animale

Module 2 : Bases de la Chirurgie et Anatomie générale

- Nœuds et sutures chirurgicaux sur pièces anatomiques et simulation 3D
- Les principaux organes et les différentes voies d'abord chirurgicales.
- Anatomie de la cavités abdominale et péritonéale, de la cavité thoracique, et des différents systèmes (ex : appareil urinaire, appareil respiratoire, appareil digestif...) et oragnes (ex : foie, pancréas, cœur, poumon...)

Module 3 : Anesthésie, analgésie, surveillance et monitoring

- La procédure chirurgicale de l'animalerie au bloc opératoire (ex: mesures d'asepsie préopératoire, prémédication de l'animal, préparation du champ opératoire avec rasage et déterision cutanée, induction de l'anesthésie, prophylaxie et analgésie au cours de l'opération...)
- Surveillance et soins post-opératoires.

Module 4 : Initiation aux procédures chirurgicales

- les différents prélèvements et biopsies
- Les différentes voies d'abords : Thoracotomie, sternotomie, laparotomie
- Techniques d'hémostase, anastomoses digestives, néphrectomie, gastrotomie, sutures vasculaires et cardiaques
- Initiation aux techniques microchirurgicales
- Evaluation fonctionnelle invasive : Méthode de pose de capteurs de mesure de pression, débit, volume...

Dans un but de remplacement, notre structure de formation s'est équipée de nombreux simulateurs de différentes spécialités chirurgicales, sur lesquels les candidats débutent les enseignements pratiques. Toutefois le recours au modèle animal est indispensable, un certain nombre de gestes ne peuvent être acquis et validés que sur un modèle opératoire proche de la clinique. La réalisation d'opération sur des animaux anesthésiés permet la visualisation in situ de la qualité des interventions et les complications sur l'animal en entier. Par exemple, La réalisation de techniques microchirurgicales s'effectue d'abord sur des prothèses en silicone pour acquérir les 1ers gestes de microchirurgie puis sur animaux anesthésiés ce qui permet la visualisation in situ de la qualité des sutures (étanchéité, patency...). Les animaux en fin de procédure ne sont pas réanimés et ne reprennent pas conscience à leur mise à mort par injection létale d'anesthésique ou de potassium.

Afin de réduire au maximum l'utilisation des animaux, leur nombre est corrélé au nombre d'étudiants. L'enseignement sera de bonne qualité avec 1 gros animal (cochon ou mouton) pour 3 à 4 étudiants et 1 petit animal (rat ou lapin) par étudiant. Pour les 5 ans d'approbation du diplôme,

150 animaux seront utilisés (30 gros animaux et 120 petits animaux, le choix de l'espèce répondant à la spécialité de modèle des stagiaires).

Les différentes espèces sont hébergées dans des conditions répondant à la réglementation en vigueur (Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques), en groupe pour les animaux sociables, et avec un enrichissement adapté (foin, tunnels, mordillos...) (Raffinement). Toutes les opérations sont réalisées sous anesthésie générale avec une prise en charge de la douleur par administration par exemple d'un morphinique. Des points limites ont été définis (réponse aux stimuli externes, réflexe cornéen, changement de rythme cardiaque et respiratoire) comme indicateur précoce d'une éventuelle douleur ou détresse d'animal. Dans ce cas, les posologies des médicaments seront adaptées.

12161 Dans le contexte de la réduction de l'utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire et afin de limiter l'émergence de la résistance bactérienne, le développement de stratégies destinées à réduire la consommation antibiotique est fortement encouragé. Le composé C est une molécule chimique, d'origine naturelle, n'étant dotée d'aucune activité antibiotique propre mais présentant des effets synergiques intéressants *in vitro* lorsqu'elle est associée à certains antibiotiques, tels que l'amoxicilline. Ainsi, l'association amoxicilline + composé C est plus active que l'amoxicilline seule sur un large panel de souches de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) d'origine vétérinaire testées *in vitro*. Toutefois, l'activité potentiatrice du composé C n'a, pour l'heure, pas été étudiée *in vivo* dans des modèles d'infection.

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'effet synergique du composé C chez la souris dans un modèle d'infection musculaire (cuisse) à *S. aureus*.

Trois phases sont prévues pour ce modèle :

1- Phase pilote chez l'animal infecté non traité afin de mettre au point le modèle d'infection et de déterminer la dose de *S. aureus* permettant d'obtenir une infection stable (modèle cuisse) ;

2- Phase pilote chez l'animal traité par le composé C seul ou par antibiotique seul (contrôle positif) ; cette étape permettra d'appréhender les doses/rythme d'administration efficaces, c'est-à-dire permettant une réduction bactérienne significative dans la cuisse ;

3- Phase d'efficacité chez l'animal infecté et traité soit par antibiotique seul, soit par l'association de l'antibiotique / composé C à différentes doses ; cette phase permettra de conclure sur l'existence ou non d'une synergie entre ces deux traitements, et ainsi d'envisager de réduire les doses d'antibiotique utilisées.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 6 par groupe (au lieu de 10) grâce à l'expérience acquise lors d'études précédentes. Des analyses *in vitro* ont déjà été réalisées sur l'efficacité du composé C. Toutefois l'efficacité de tels composés ne peut être confirmée que dans des modèles précliniques (notamment pour des aspects de diffusion tissulaire), c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée. Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance accrue sera également réalisée pour cette étude (raffinement). L'infection musculaire sera réalisée par du personnel expérimenté et représente une douleur de classe légère (la classe légère ne nécessite pas d'anesthésie). De plus compte tenu de la durée de l'expérience (8h) aucun antalgique ne sera administré et aucun signe de septicémie n'est attendu.

222 souris CD1 sont nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet.

12162 L'ostéoporose, l'arthrose ou l'arthrite sont des pathologies ostéo-articulaires qui concernent une part importante de la population mondiale sur Terre à l'origine d'inconforts, de douleurs, d'infirmités et de morbidités. Mieux comprendre et prévenir ces maladies est un enjeu de société pour tous. Aussi notre laboratoire accompagne depuis plusieurs décennies l'exploration spatiale ou la microgravité est responsable d'une perte osseuse importante.

Afin de mieux prévenir ces pathologies sur terre ou dans l'espace, notre laboratoire s'attache à comprendre les mécanismes qui modulent la formation et la résorption osseuse en lien avec le réseau vasculaire dans différentes situations physiologiques chez le rongeur pouvant mimer ces maladies. Ces mécanismes étant en lien avec la biologie du cartilage.

Dans ce cadre, nous souhaitons développer des techniques permettant d'optimiser les études fonctionnelles et dynamiques de l'os et du cartilage ex-vivo en complément des techniques structurelles classiques d'histologie. D'une part, par l'injection de différentes molécules fluorescentes à haute affinité pour les fronts de minéralisation (marqueurs) de l'os (formation osseuse) et pour les environnements vasculaires (traceurs) qui sont des régulateurs centraux de la perfusion de l'os et du cartilage. D'autre part en développant une imagerie microscopique innovante pour observer et quantifier ces particules fluorescentes.

Les marqueurs fluorescents de formation osseuse (minéralisation) sont déjà utilisés chez le rongeur et bien décrits.

Le réseau vasculaire et sa perméabilité sont classiquement mesurés chez les rongeurs par la diffusion de colorants vitaux (traceurs) tels que des petites molécules fluorescentes. La plupart de ces colorants intra-vitaux sont déjà utilisés en médecine humaine, en angiographie, ophtalmologie et cancérologie.

Ce couplage de techniques des différents marquages fluorescents de l'architecture osseuse et des flux vasculaires nous permettra de mieux comprendre le remodelage osseux (formation/résorption) et vasculaire au cours de la vie de l'animal et de son développement.

Ce projet à long terme nécessite la fourniture d'os de rongeurs après injection de marqueurs et traceurs pour la mise au point de systèmes innovants d'imagerie optique et/ou électronique.

Avec l'intérêt d'utiliser ce couplage de techniques sur des génotypes, des sexes et des âges de souris différents, l'allaitement semble également un bon modèle de validation biologique des marqueurs fonctionnels de perfusion vasculaire et de remodelage ostéo-articulaire. En effet, c'est un modèle caricatural de perte et récupération de la masse osseuse et de sa porosité.

Les différentes étapes du projet ;

1/ Nous procéderons à l'établissement d'une cinétique de perfusion et drainage des cellules osseuses (ostéocytes) par des traceurs fluorescents (fluorescéine, bleu patente, bleu Evans) sur 4 temps allant de 30sec à 48h post injection.

2/ Nous évaluerons avec ces techniques, les paramètres osseux et vasculaires liés à l'âge en continu sur des souris mâles hébergées par 4 dans des cages standards, de 4 semaines à 20 mois, avec des points de mesure hebdomadaires jusqu'à 6 mois, bi-hebdomadaires de 6 mois à 12 mois et mensuels entre 12 et 20 mois.

3/ Nous comparerons, après avoir marqué la formation osseuse, les modifications physiologiques osseuses et vasculaires pour les souris en activité et sédentarité à l'âge de 4 mois, 6 mois, 12 mois, 18 mois, grâce de deux types de cages pour rongeurs, l'une simulant l'activité et l'autre simulant la sédentarité.

4/ Nous évaluerons également les modifications physiologiques osseuses et vasculaires sur 5 périodes de la vie des souris femelles contrôles et en reproduction. A la fin de la gestation, au début de l'allaitement, au milieu de l'allaitement, à la fin de l'allaitement et 6 semaines après la fin de l'allaitement, à deux âges différents des souris en début de gestation (10 semaines et 6 mois), et sur 5 génotypes différents. En comparaison avec des souris contrôles.

Soit un total de souris mâles et femelles pour les 4 étapes du projet de 1424 souris sur 5ans.

Ce nombre comprend les animaux pour effectuer les différents groupes et ne peut-être plus diminué sans risque de mettre en péril l'interprétation statistique.

Les objectifs de ce projet utilisant ces colorants pour la plupart intra-vitaux pour l'homme, sont :

- Valider une imagerie exploratoire et quantitative osseuse et vasculaire chez le rongeur, liée à l'âge, en activité et sédentarité et au cours de la reproduction.
- Cartographier les modifications de l'activité osseuse et vasculaire.

- Valider une technique intégrative et corrélative d'imagerie microscopique innovante avec une imagerie par scanner aux rayons X sur les mêmes échantillons osseux.

Dans le cadre de cette étude, nos observations concernent des phénomènes physiologiques qui ne peuvent être observés qu'ex-vivo chez l'animal et ne sauraient être remplacés par des observations in-vitro, ni être étudiés directement chez l'homme.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont. Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi (copeaux, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

12163 Les pathologies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité et le vieillissement de la population en accroît l'importance. De plus, des pathologies comme l'hypertension artérielle, le diabète ou les pathologies ischémiques (coronariennes, cérébrales, rénales ou périphériques) surviennent d'autant plus fréquemment que l'âge des sujets avance. De manière générale les femmes sont moins atteintes de maladies cardiovasculaires que les hommes mais cette tendance s'inverse après la ménopause, laissant penser à un rapport de cause à effet entre la production d'hormones féminines (œstrogènes) et une protection des accidents vasculaires. Au laboratoire, nous nous intéressons à la réponse flux dépendante des vaisseaux ex vivo ou in vivo avec le modèle de remodelage extensif induit par le flux (contrainte de cisaillement). Nous avons démontré que le récepteur de type 2 de l'angiotensine II (AT2R) et le récepteur des œstrogènes alpha (ER α) sont tous deux impliqués dans ce remodelage. L'activation de ces deux récepteurs est réciproquement due à la production d'IL-17 par les cellules T, et par les œstrogènes, et à la production de NO. Afin de confirmer cette observation nous souhaiterions utiliser des souris déficientes en œstrogènes sur les cellules T. Cet aspect sera étudié plus en détail par l'utilisation d'un modèle de souris génétiquement modifié pour le récepteur aux œstrogènes dans les cellules lymphocytaires, cellules qui expriment le CD4 (Souris CD4ERaKO). Pour cette étude 320 animaux seront nécessaires au maximum. Nous appliquons la règle des 3R. Toutes les procédures chirurgicales seront accompagnées d'une analgésie pré et postopératoire (injection de Buprénorphine). L'animal sera suivi au réveil et dans les premières heures suivant l'opération, puis quotidiennement. Une grille de score pour l'évaluation de la douleur sera utilisée avec détermination du point limite. Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle in vitro, car le remodelage vasculaire met en jeu le système immunitaire et hormonal. Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Nous utiliserons le test de student et des tests d'Anova deux voies avec post-test de Bonferroni. Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux de plus les cages sont enrichies par des jouets.

12164 Les tiques constituent un risque majeur pour la santé humaine et animale en transmettant la plus grande variété d'agents pathogènes (bactéries, parasites et virus). Parmi les 170 virus transmis par les tiques, peu d'entre eux sont étudiés au sein de leur modèle arthropode. En raison de leur cycle de réplication rapide et de leur grande taille de population, les virus transmis par les arthropodes existent sous forme de populations de variants/souches avec des génomes étroitement proches, mais pas identiques appelés quasi-espèces qui leur permettent de s'adapter très rapidement aux nouveaux environnements. Néanmoins, une sélection efficace semble dominer l'évolution génétique de ces virus entraînant une stabilité de leur génome qui pourrait être due au fait que ces virus sont obligés d'alterner entre un hôte vertébré et un hôte invertébré pour se maintenir dans la nature. Malgré tout, ces virus gardent la capacité de générer des souches capables d'exploiter de nouveaux environnements et d'induire des émergences comme le démontre les épidémies dues au virus ZIKA en 2015. Ces dernières années, des virus connus, transmis par les tiques, ont émergés dans de nouveaux territoires (Encéphalite à tique (TBE), Louping ill, Powassan, Deer tick, et la

Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo (CCHF) tandis que de nouveaux virus, parfois mortels, ont été découverts (Bourbon USA 2014, Heartland USA 2012, Virus SFTSV Chine 2011). Afin de mieux comprendre ces phénomènes d'émergence, nous nous proposons d'évaluer la variabilité génétique et l'adaptation de 4 virus (Colorado tick fever (CTF) (Coltivirus), Kemerovo (Orbivirus), TBE et Louping ill (Flavivirus) transmis par les tiques à leur hôte invertébré et vertébré. Ce travail devrait nous permettre de répondre aux questions suivantes : (1) l'alternance d'hôte, comparativement au passage en continu dans le même hôte, contraint-elle l'évolution des virus transmis par les tiques ? ; (2) la variabilité génétique de ces virus est-elle différente lors de passages in vitro versus in vivo ? A plus long terme, ce travail nous permettra d'identifier les gènes qui semblent plus contraints au niveau évolutif et qui pourraient donc constituer de potentielles cibles antivirales. Les protocoles ont été conçus dans les règles des 3 R avec tout d'abord une réduction au maximum de la douleur : Il n'y a pas de souffrance particulière attendue suite au gorgement des tiques, seule la pose de la capsule peut générer un inconfort, de plus selon le virus utilisé il peut y avoir des signes neurologiques qui se développent chez les souris, dans ce cas les souris seront mises à mort dès qu'une paralysie sera constatée. En ce qui concerne le raffinement, ces expériences nécessitent l'utilisation de souris pour comparer les résultats obtenus in vitro à ceux que l'on obtiendra in vivo et permettront de statuer sur la nécessité d'utiliser des modèles in vivo pour d'autres virus d'intérêt. Au total 5616 souris au maximum seront utilisées à travers 4 procédures. Le nombre de souris sera potentiellement très fortement réduit si les expérimentations se déroulent correctement dès le premier essai, et si moins de souches de virus sont disponibles par rapport aux 3 souhaitées par virus.

12165 En production porcine, les porcs mâles sont généralement castrés au cours de la première semaine de vie afin de limiter la présence d'odeurs sexuelles dans la viande. Cette pratique est de plus en plus souvent remise en cause et des alternatives sont proposées pour l'élevage de mâles entiers, mais qui s'accompagnent de la production de viande parfois odorante. Une pratique alternative consiste à vacciner les porcs contre une hormone responsable du développement sexuel. Elle permet de supprimer les odeurs de la viande mais s'accompagne d'une forte augmentation de l'ingestion d'aliment en fin d'élevage, générant un engraissement des carcasses et des rejets environnementaux importants. Il est possible de diminuer les concentrations en nutriments et énergie de l'aliment pour limiter ces effets négatifs, mais sans toutefois réussir à les corriger complètement. Le projet vise à caractériser la régulation de l'ingestion chez le porc en comparant les réponses métaboliques des animaux selon leur statut sexuel et l'aliment ingéré. Pour cela, les performances de croissance, la production de chaleur, l'oxydation des nutriments et les profils métaboliques de 56 porcs seront étudiés.

Règle des 3R. Remplacement: l'étude est réalisée sur des animaux car nous nous intéressons justement à la réponse animale aux caractéristiques de l'aliment et en fonction de son statut sexuel. Réduction: Nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire au projet sur la base d'études précédentes et afin d'obtenir une puissance statistique suffisante sur les paramètres étudiés. Raffinement: Toutes les mesures seront réalisées par du personnel formé et expérimenté. Les animaux bénéficieront d'un suivi très proche par les animaliers ainsi que par les différents intervenants. Toute intervention potentiellement douloureuse ou stressante sera contrôlée, et les animaux suivis dans les minutes ou heures qui suivent. En cas de souci de santé, le vétérinaire sera consulté et les animaux traités en conséquence.

12166 Il n'existe à ce jour aucun traitement antiviral contre les Flavivirus et bien qu'il existe un vaccin contre le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), il n'y a encore aucun vaccin contre le virus West Nile (WNV) pour l'Homme. Des études en culture cellulaire ont démontré qu'une infection par un virus peut être diminuée par la présence de génomes non fonctionnels de ce même virus (non virulents). Nous proposons de tester l'utilisation de génomes non virulents de Flavivirus chez l'animal. Le but est de déterminer si ces génomes non fonctionnels pourraient agir de façon thérapeutique en empêchant l'infection. Cette technique pourrait donc constituer une nouvelle approche antivirale contre la famille des Flavivirus.

Le recours à l'animal est nécessaire afin de déterminer si cette approche, qui est prometteuse en culture cellulaire, peut protéger contre l'infection in vivo. L'infection expérimentale chez la souris par les virus WNV et JEV est un bon modèle d'étude des encéphalites viro-induites, déjà décrit dans la littérature et pour cela couramment utilisé. Ce modèle offre des possibilités d'étude exploratoire pour déterminer les conditions d'administration idéales afin d'obtenir un effet antiviral : la dose, la voie d'administration, le temps de traitement avec les génomes non virulents (appelés TIPs pour « Therapeutic Interfering Particles »). Seuls les TIPs les plus performantes en culture cellulaire seront caractérisées chez l'animal. 4 procédures (1 de sévérité légère, et 3 de sévérité modérée) seront mises en œuvre sur des souris femelles âgées de 3 à 4 semaines. Un maximum de 770 souris pour le virus WNV et 1010 pour le virus JEV sera nécessaire sur une durée de 5 ans. Nos analyses statistiques nous permettent de limiter le nombre de souris à 5 pour chacune des procédures expérimentales et de points d'analyse : différentes concentrations de TIPs (de WNV et de JEV, procédure n°2), administrées par différentes voies (procédure n°4) avant ou après infection par chaque virus sauvage (procédure n°3). L'innocuité du traitement (administration des TIPs sans infection) sera testée (procédure expérimentale n°1). Le nombre de TIPs à tester sera déterminé à partir des résultats obtenus in vitro mais ne dépassera pas 5 TIPs différentes pour chaque virus. Les procédures expérimentales seront répétées un maximum de trois fois. L'infection par les virus WNV et JEV est létale, les symptômes apparaissant en général à partir des jours 7 (WNV) ou 9 (JEV). Les souris seront suivies quotidiennement pendant l'infection et les points limites décrits dans la littérature seront respectés pour réduire toute souffrance. L'évaluation de la charge virale sera effectuée sur les organes des souris mises à mort pour permettre de comparer celle-ci entre les animaux traités ou non.

12167 Les porcs se bagarrent régulièrement au cours de leur élevage et plus particulièrement au cours des regroupements qui ont lieu lors du passage d'une phase d'élevage à une autre, par exemple lors du ou de l'entrée en engraissement. Ces bagarres sont sources de lésions cutanées et de problèmes de bien-être. Pouvoir les détecter automatiquement faciliterait l'utilisation de leur nombre comme critère d'évaluation du bien-être animal. De plus, cela pourrait permettre une sélection génétique contre les comportements agressifs car leur nombre est proportionnel à l'agressivité des porcs et nous savons par ailleurs que ce nombre est un caractère héritable. La détection automatique que nous proposons repose sur la détection spécifique de la présence d'hémoglobine à l'aide d'une caméra multi-spectrale. Un prototype a été développé. L'expérience prévue vise à déterminer pendant combien de temps après leur apparition les lésions peuvent être détectées et à valider la méthode en corrélant les résultats de la mesure avec une détection visuelle par un observateur entraîné et en les corrélant avec le nombre de morsures effectuées par les porcs. Compte tenu des objectifs du travail, l'expérience nécessite de travailler sur des porcs vivants présentant des lésions cutanées. Pour les obtenir, nous induirons des bagarres en regroupant des porcs de deux loges différentes pendant une durée maximale de 3 heures. Les porcs seront filmés pendant la période de regroupement et le nombre de morsures mesuré par analyse des bandes vidéos. Des photos seront prises avant le regroupement, 2, 26, 50 et 74 heures après la fin des regroupements. Au total, 32 porcs seront concernés. Ce nombre d'animaux est nécessaire pour obtenir une variabilité suffisante afin de corréliser le comportement, les lésions détectées par l'œil humain et celles détectées par la caméra. La procédure appliquée aux animaux (regroupement d'animaux non familiers) est fréquente dans les élevages commerciaux et induit une douleur et un stress de classe modérée. Afin de limiter la douleur et le stress, des observations seront réalisées à intervalles réguliers pendant la phase de regroupement pour retirer un animal de la loge dès qu'il présentera une lésion avec effraction des tissus au-delà de la peau. Après le regroupement, les animaux seront observés jusqu'à la cicatrisation des lésions. Si besoin, un traitement médicamenteux sera appliqué pour empêcher une infection, favoriser la cicatrisation et réduire la douleur.

12168 Ce projet se résume à l'administration d'un gène thérapeutique via un vecteur dans l'œil de lapin ou de chien par une injection dans une structure oculaire suivie éventuellement d'une électroporation

appliquée sur cette structure. La méthode d'administration est identique à celle réalisée chez l'homme.

Cette application de thérapie génique est destinée aux traitements de maladies oculaires chez l'homme, sévères ou réfractaires à tout traitement et potentiellement cécitante.

Ce projet permet d'évaluer la toxicité potentielle et la biodistribution tissulaire du gène thérapeutique chez l'animal.

L'espèce est déterminée en fonction des homologues avec l'homme, notamment dû à la taille de l'œil qui se rapproche de celle de l'Homme, afin de pouvoir appliquer le dispositif médical servant à l'électroporation.

Les animaux choisis sont le lapin et le chien. Le lapin est l'espèce la plus couramment utilisée pour l'évaluation de la toxicité oculaire. L'œil de lapin est suffisamment grand pour permettre la réalisation de traitements spécifiques. Une espèce non pigmentée de lapin, telle que le New-Zealand White Rabbit est habituellement utilisée et acceptée par les autorités réglementaires. Le chien est aussi une espèce régulièrement utilisée pour l'évaluation de la toxicité oculaire. L'œil de chien est suffisamment grand pour permettre la réalisation de traitements spécifiques.

L'évaluation de la toxicité et la biodistribution tissulaire d'un composé biologique administré in situ sont 2 étapes qui ne peuvent pas être réalisées in vitro. Il n'existe pas de méthodes alternatives in vitro pour ce type de procédure de traitement, en raison notamment de la complexité que représente un organisme vivant.

Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet peut être estimé à un total de 300 lapins et 80 chiens. Les 2 yeux de l'animal sont traités pour réduire le nombre d'animaux de 50%. Le nombre d'animaux utilisés est déterminé à minima afin d'obtenir des résultats robustes d'un point de vue statistique et ainsi d'atteindre tous les objectifs de l'étude en procédant à toutes les analyses nécessaires sur un nombre d'animaux optimisé pour évaluer la biodistribution.

L'administration du produit biologique est réalisée sous anesthésie générale et locale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur. Des soins adéquats sont appliqués pour éviter l'inconfort et la douleur éventuelle post-traitement. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et est évalué par rapport à des points limites définis de façon à limiter l'inconfort/la souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance envisagée d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée. L'hébergement des lapins et des chiens est effectué conformément à la Directive 2010/63. Un soin particulier est accordé à l'enrichissement (renforcement positif, jouet, musique).

12169 En élevage porcin, le portage digestif de souches d'*Escherichia coli* multi-résistantes aux antibiotiques, et en particulier de souches résistantes aux céphalosporines de troisième génération productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE), constitue un danger en termes de santé publique. En effet, ces souches peuvent diffuser entre animaux, de l'animal vers l'éleveur et vers l'environnement ainsi que de l'animal vers le consommateur lors de contaminations des denrées alimentaires. Ces souches multi-résistantes peuvent être pathogènes ou peuvent transmettre leurs gènes de résistance à d'autres souches pathogènes pour l'animal ou pour l'homme. Nous recherchons donc une solution pour limiter le portage digestif de souches d'*E. coli* résistantes. Des essais précédents nous ont permis de montrer que l'administration à des porcs de la souche d'*E. coli* ED1a (ED1a), souche non pathogène sensible aux antibiotiques et fortement colonisatrice réduisait dans certains cas le portage d'une souche d'*E. coli* non pathogène, multi-résistante déjà présente chez les animaux lors de l'administration d'ED1a. Nous souhaitons maintenant évaluer l'effet protecteur de l'administration d'ED1a associée au probiotique *E. coli* Nissle 1917 (Nissle) à la truie puis aux porcelet, vis-à-vis d'une contamination par une souche multi-résistante inoculée juste après le sevrage des porcelets. L'expérimentation sera conduite dans des animaleries protégées sur des porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés. Cinquante-six animaux comprenant huit truies et quarante-huit porcelets seront utilisés au total. Ainsi, un lot de vingt-quatre porcelets, issus de quatre truies traitées par voie orale par ED1a et Nissle, recevra par voie orale

ED1a et Nissle. Un second lot comprenant vingt-quatre porcelets, issus de quatre truies non traitées, ne recevra pas ED1a et Nissle. Après le sevrage, tous les porcelets seront inoculés par voie orale avec la souche E. coli non pathogène multirésistante productrice de bêta-lactamases à spectre élargi. Des prélèvements de matières fécales seront effectués régulièrement sur les truies et les porcelets, pour contrôler l'implantation d'ED1a et de Nissle, et comparer les niveaux de portage de la souche multi-résistante chez les porcs ayant reçu ou non ED1a et Nissle. Une analyse statistique permettra d'évaluer l'impact de l'administration aux truies et aux porcelets d'ED1a et Nissle sur le nombre de bactéries et de gènes de résistance présents dans les matières fécales des porcs contaminés juste après le sevrage. Ces résultats ne peuvent être obtenus que par expérimentation sur l'espèce cible. Le protocole expérimental n'entraînera pas de souffrance, les souches utilisées étant non-pathogènes. Le nombre d'animaux est calculé de manière à obtenir des résultats significatifs en utilisant un minimum d'animaux par lot. Les inoculations seront faites par voie orale. Les animaux seront vus au moins une fois par jour. Ils seront élevés en groupe stable, disposeront d'objets manipulables, auront accès à l'alimentation et à de l'eau à volonté. Ils disposeront de lampes chauffantes ainsi que des plaques de couchage. Ils seront pesés chaque semaine. Leur température corporelle sera mesurée chaque jour afin de suivre l'évolution de leur état de santé. Afin de réduire le stress des animaux, les prélèvements seront collectés lors des prises de température rectale. Le remplacement n'est pas envisageable, les animaux utilisés étant nécessaires pour évaluer l'efficacité de l'administration d'ED1a et de Nissle à la truie et au porcelet sur le portage de souches résistantes par le porcelet.

12170 L'obésité est souvent associée à une inflammation de bas niveau au niveau de nombreux tissus périphériques (foie, tissu adipeux) mais aussi centraux comme la muqueuse intestinale. Cette inflammation joue un rôle essentiel dans la mise en place des maladies métaboliques associées à l'obésité, telles que l'insulinorésistance, le diabète, la stéatose hépatique non alcoolique, etc. Un déséquilibre dans la composition du microbiote intestinal semble jouer un rôle clé dans le développement de ces maladies. Il existe un besoin urgent de comprendre les mécanismes inflammatoires dérégulés chez les sujets obèses et en particulier au niveau de l'intestin. Le but de ce projet est d'étudier les effets pro ou anti-inflammatoires de certaines protéines du système immunitaire inné de la muqueuse intestinale telles que des cytokines ou des peptides antimicrobiens. Ces protéines seront délivrées à des souris au niveau de la muqueuse intestinale par des bactéries lactiques recombinantes. A terme, ces études ouvrent de nouvelles pistes thérapeutiques visant à améliorer le statut métabolique et inflammatoire du tissu adipeux et par cette voie à réduire l'impact des comorbidités liées à l'obésité humaine. Les souris recevront les bactéries lactiques recombinantes par gavage quotidien, ceux-ci étant réalisés par des expérimentateurs entraînés à la contention et au gavage. Un suivi de la survenue éventuelle de diabète et d'obésité est effectué (prélèvements sanguins) sur toute la durée de l'expérience (22 semaines).

Les mécanismes étudiés reposent sur des interactions complexes non reproductibles par la culture d'organes séparés, impliquant de recourir à l'animal. Nous utiliserons 960 souris en 3 ans, espèce présentant les modèles les plus reconnus. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum possible sans nuire à la qualité statistique des données. Leur litière est changée régulièrement, l'eau et la nourriture sont disponibles à volonté, et la température et l'hygrométrie sont régulées. Pour favoriser leur bien-être, leur environnement est enrichi par l'ajout de cellulose à déchiqueter. En expérimentation, les animaux sont observés plusieurs fois par semaine. Pour limiter au maximum le stress et la douleur, des points limites sont clairement définis à l'avance. Tous les animaux sont euthanasiés en fin d'expérience.

12171 Notre équipe s'intéresse aux fonctions des neuropeptides de la famille de l'urotensin II. À ce jour, quatre formes d'urotensine II (UII, URP, URP1 et URP2) ont été identifiées chez les vertébrés, tous présents chez les poissons. Les neuropeptides sont des petits peptides sécrétés, notamment par des neurones, qui peuvent agir localement comme neuromédiateur ou à distance comme hormone. Ils exercent leurs fonctions par l'intermédiaire de récepteurs appartenant à la superfamille des

récepteurs couplés aux protéines G. Chez les poissons cinq récepteurs différents ont été identifiés (uts2R1 à 5). S'il existe des données sur le rôle de ces peptides chez l'adulte, nous ne savons à peu près rien de leurs fonctions au cours du développement embryonnaire et larvaire. Notre projet vise donc à étudier les fonctions de ces neuropeptides ainsi que celles de leurs récepteurs au cours du développement embryonnaire et larvaire.

Pour ce projet, nous utilisons le modèle poisson zèbre (*Danio rerio*). Cet animal est un formidable modèle pour l'étude du développement chez les vertèbres car il présente une somme d'avantages unique. En particulier, l'embryon est transparent et se développe à l'extérieur de la mère et il est possible de créer des animaux génétiquement modifiés par des techniques avancées d'ingénierie du génome. Ces avantages et la conservation des mécanismes qui contrôlent le développement embryonnaire des vertébrés permettent au poisson-zèbre de remplacer avantageusement les modèles mammifères tels que la souris ou le rat.

Des données obtenues au laboratoire montrent que l'inactivation des gènes codant les peptides URP1 et URP2 ainsi que du gène codant le récepteur Uts2R4 entraîne des malformations de la colonne vertébrale. Ces malformations sont de types scolioses et cyphoses et lordose. Notre projet est de comprendre la nature de ces malformations ainsi que de déterminer comment ces malformations apparaissent et évoluent au cours du développement larvaire et de la croissance des animaux. Pour cela nous allons donc produire des animaux chez qui ces gènes sont inactivés. Ces animaux seront élevés jusqu'au stade désiré (8, 10 et 15 jours, 3, 4, 5, 6, 8 et 12 semaines et 6 mois (adulte) afin de pouvoir analyser les malformations par des approches histologiques et moléculaires (RT-qPCR). Il est important de noter que les malformations observées ne semblent pas ralentir la croissance des animaux.

Notre projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacer : L'étude dynamique des processus de morphogenèse (croissance et acquisition de la forme des tissus, organes et embryons) est essentielle pour comprendre de nombreuses étapes du développement embryonnaire normal et pathologique. La morphogenèse de tissus et d'organes complexes, comme le système nerveux central, ne peut être reproduite totalement in vitro et nécessite de recourir à des organismes modèles animaux.

- Réduire : Pour notre projet sur 5 ans, nous prévoyons d'utiliser un maximum de 6000 animaux. Nous prévoyons d'analyser des animaux de 3 génotypes différents à dix stades différents : 8, 10 et 15 jours, 3, 4, 5, 6, 8 et 12 semaines et 6 mois (adulte). Pour chaque stade et génotype, nous prévoyons de produire 10 lots. Des lots de 20 animaux seront utilisés afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Nous prévoyons une dizaine d'analyses.

- Raffiner : Les animaux sont élevés dans des conditions d'élevage optimisées pour assurer leur bien-être. Des observations quotidiennes permettent de suivre leur état de santé avec une attention particulière aux animaux qui présentent les malformations étudiées.

12172 Les dysménorrhées, ou règles douloureuses, sont l'une des affections gynécologiques les plus courantes chez les femmes en âge de procréer et restent actuellement sous-diagnostiquées et sous-traitées. On distingue les dysménorrhées primaire et secondaire (liées à des pathologies associées comme l'endométriose, l'adénomyose, les fibromes utérins, etc.), la dysménorrhée primaire étant l'objet du projet actuel.

La dysménorrhée primaire se caractérise par des crampes abdominales douloureuses, juste avant et/ou au moment des règles, en dehors de toute autre pathologie pelvienne identifiée. Elle survient généralement à l'adolescence, lors des premières règles ou quelques mois après. La douleur associée dure entre 8 et 72h, est plus sévère en début de cycle et irradie dans le dos et les cuisses. Elle peut s'accompagner de symptômes tels que nausées, vomissements, diarrhées, fatigue et insomnies. Les facteurs de risque incluent la consommation de tabac et d'alcool, l'apparition précoce des premières règles, des règles longues et abondantes, un indice de masse corporelle élevé, la nulliparité et les antécédents familiaux.

L'hypothèse avancée pour expliquer la pathologie est la surproduction de prostaglandines au niveau utérin. L'augmentation de la libération de prostaglandines durant la desquamation de l'endomètre

pourrait entraîner une hypercontractilité du muscle sous-jacent, il en résulte une ischémie/hypoxie du muscle qui entraînerait la douleur. De ce fait, la principale prise en charge pharmacologique de la dysménorrhée primaire consiste à la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui sont efficaces chez 65 à 100 % des femmes. Néanmoins, un pourcentage de femmes ne répondant pas positivement à ce traitement ou intolérantes nécessitent une autre approche.

L'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle permettant de visualiser les contractions utérines induite par l'oxytocine chez la ratte ou la souris éveillée et prétraitée par des œstrogènes afin de tester des candidats médicaments pouvant inhiber les contractions et diminuer la douleur associée. Des études fonctionnelles sur muscle utérin en cuve à organe isolé pourront venir compléter les tests in vivo sur les mêmes animaux. Ainsi, cette stratégie permet de réduire sensiblement le nombre d'animaux pour une étude vivo/vitro.

Cependant, actuellement, les méthodes alternatives in vitro et ex vivo permettant d'étudier la douleur utérine dans son ensemble n'existent pas, c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre et traiter cette pathologie.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux (animaux seront nourris ad libitum et hébergés en groupe). Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours afin de détecter l'apparition de points limites (perte de poids supérieure à 20% de leur poids initial, prostration, agressivité,...). Afin de limiter leur angoisse, les administrations seront réalisées par du personnel compétent.

Ainsi le projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3Rs.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 530 rats et 530 souris à raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de 8 animaux inclus), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

Dans le cas de prétraitements par des substances d'intérêt, un nombre minimal d'animaux sera utilisé pour réaliser l'étude en respectant la règle des 3 R.

12173 Quelles soient d'origine infectieuse, liées à une consommation excessive d'alcool ou à un régime alimentaire riche en graisses, les maladies du foie deviennent souvent chroniques augmentant considérablement les risques de développement de cancer du foie. Ces maladies du foie, aussi nommées hépatites, sont donc très préoccupantes en terme de santé publique. Afin d'améliorer nos connaissances sur ces maladies, notre équipe se consacre à comprendre certains mécanismes qui surviennent au cours de ces pathologies. Nous nous intéressons plus particulièrement aux mécanismes impliqués dans la mort des principales cellules du foie : les hépatocytes. Nos travaux cherchent à déterminer si cette mort cellulaire peut subvenir par un mécanisme particulier, nommé nécroptose, un processus de mort qui implique la protéine MLKL.

Pour répondre à cette question, nous allons baser nos recherches sur l'utilisation de souris modifiées génétiquement qui n'exprimeront plus la protéine MLKL dans les hépatocytes. Le projet inclut l'étude du foie de ces souris pour évaluer l'impact du déficit de cette protéine sur la physiologie du foie en condition basale, non-pathologique, et en condition pathologique induite par l'injection d'une molécule d'origine végétale (Concanavaline A) capable de déclencher une hépatite aiguë. Dans ce modèle, la maladie apparaît très vite et est guérie en moins de 2 jours. La durée de l'expérimentation sera donc inférieure à 24h. Les organes prélevés sur les animaux euthanasiés seront analysés par différentes méthodes pour quantifier l'atteinte hépatique et l'inflammation, et pour caractériser les étapes de développement de la mort des hépatocytes. Une hépatite sera également induite chez des souris non modifiées génétiquement pour rechercher de nouveau(x) partenaire(s) moléculaire(s) de cette protéine MLKL. Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué au nombre de 175. Ce protocole établi suit la règle des 3R "Remplacer, Réduire, Raffiner" :

- Aucun moyen de remplacer de telles études par des tests in vitro, car elles englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique, incluant une inflammation avec migration dans le foie de cellules provenant d'autres parties de l'organisme.

- Réduction du nombre de souris pour obtenir une validation statistique des résultats ;

- L'étude a été raffinée en envisageant un grand nombre de mesures sur les échantillons prélevés au niveau des 2 organes touchés par la maladie pour récolter un maximum d'informations. Les souris seront traitées dans une pièce isolée de leurs congénères sur un temps court. L'ensemble des gestes réalisés sur animaux vigiles sont effectués de façon à réduire au maximum la douleur, à la fois par l'utilisation d'analgésiques locaux quand cela est nécessaire et par la maîtrise parfaite des gestes par les manipulateurs.

A terme, les données de ce travail pourraient permettre de mieux définir les stratégies de traitement des hépatites auto-immunes, voire d'évaluer l'intérêt d'une thérapeutique basée sur l'inhibition pharmacologique de MLKL et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles (nouveau(x) partenaire(s) de MLKL).

12174 nous présentons un exposé au public (scolaire et tout public) sur l'apprentissage chez les animaux en particulier chez le rat.

Intitulé l'École des rats, cet exposé illustre l'espace consacré à la mémoire et l'apprentissage en salle de biologie animale. Cet exposé permet d'éveiller la curiosité des visiteurs et de susciter de nombreuses questions. Questions qui trouveront réponses auprès des médiateurs scientifiques lors de l'animation.

Le parcours appris par nos rats est constitué de 5 apprentissages successifs, on parle d'apprentissages en chaîne. Le rat doit appuyer sur une pédale pour ouvrir une porte, parcourir un labyrinthe, faire un choix entre deux portes et enfin tirer sur un trapèze pour recevoir une bille qu'il devra déposer dans un trou afin d'obtenir sa récompense alimentaire. La méthode d'apprentissage utilisée est le conditionnement opérant à renforcement positif. Le rat apprend un geste qui, de façon répétée, est associé à une récompense (distribution de nourriture). Il va donc apprendre à faire un lien entre son comportement et un événement de son environnement.

Le rat doit être motivé pour apprendre. Sa motivation est la faim et la gourmandise. Cependant, pour les premières étapes de l'apprentissage sa motivation sera la curiosité et le désir d'explorer. Il nous faut préciser que l'animal n'est jamais totalement privé de nourriture, celle-ci est réduite et est distribuée après la séance d'entraînement.

Cette expérience d'apprentissage est non traumatisante pour l'animal. De plus, l'espèce choisie (*Rattus norvegicus*) a un mode de vie compatible avec les conditions d'hébergement dans un musée et peut être présentée au public sans danger.

Nous travaillons avec des rats mâles de la souche Zucker Fatty (Fatty témoin donc pas obèse). Ils arrivent dans nos locaux à l'âge de 6 semaines et par paire. Placés dans une cage commune, ils sont nourris à volonté et manipulés quotidiennement lors des soins et du nourrissage. Vers l'âge de 2 mois, les deux jeunes rats sont séparés et auront chacun leur propre cage. Cette séparation évite les conflits et permet de contrôler la quantité de nourriture distribuée. Une fois âgés de 3 mois, les rats vont commencer leur apprentissage d'une durée moyenne de 4 mois à raison de 4 à 5 séances hebdomadaires. Il faut préciser que l'apprentissage nécessite du calme et de la concentration pour le rat mais aussi pour le dresseur : il sera donc effectué en dehors de la présence du public. L'apprentissage terminé, les rats effectueront le parcours devant le public lors des exposés.

Un rat ne pouvant pas travailler 2 fois dans la même journée et afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, 2 rats travaillent quotidiennement. Un planning hebdomadaire est donc établi : chaque rat travaille 3 jours par semaine puis dispose d'une semaine entière de repos. Compte tenu des périodes de repos et de travail, 6 rats sont nécessaires en permanence afin d'assurer les 2 exposés quotidiens. Les rats étant présentés jusqu'à l'âge de 24 mois environ, de nouveaux apprentissages sont régulièrement entrepris (4 rats sont dressés chaque année).

Dans le cadre de ce projet, 22 rats mâles seront donc utilisés au total sur la période de 5 ans.

Pour respecter la règle des 3R, les rats sont observés et manipulés tous les jours. Une pesée quotidienne permet de suivre leur évolution pondérale et d'ajuster, si besoin, la quantité de nourriture distribuée. De plus, lorsque les rats sont au repos, ils sont placés dans une enceinte de grande dimension (« chambre de récréation ») dans laquelle l'animal dispose de nombreux produits d'enrichissements (tunnels en carton, hamac ...) lui permettant d'exprimer pleinement son répertoire comportemental.

12175 Les parasites *Leishmania* sont transmis à l'hôte mammifère par la piqûre d'un insecte vecteur et sont responsables de maladies parasitaires cutanées, muco-cutanées ou viscérales, cette pathologie dépendant de l'espèce en cause. Ainsi les *Leishmania* (*L.*) *donovani* et *infantum* provoquent une pathologie viscérale, mortelle en absence de traitement. Il n'existe à ce jour aucun vaccin et outre leur toxicité, les médicaments disponibles sont de moins en moins efficaces en raison notamment de l'apparition de parasites résistants vis-à-vis de ces traitements. Le développement de nouvelles thérapies préventives ou curatives dépend de la compréhension de la biologie de ces parasites complexes.

Les *Leishmania* se développent dans l'insecte sous une forme longue, flagellée et mobile appelée « promastigote ». Lorsque ces derniers sont transmis par piqûre aux hôtes mammifères ils sont capturés par des cellules du système immunitaire au sein desquelles ils se transforment en « amastigotes » caractérisés par une forme ronde dépourvue de flagelle. La multiplication des amastigotes à l'intérieur des cellules provoque à terme la maladie. Celle-ci se manifestera par une augmentation de la taille de la rate et du foie, organes cibles, où l'espèce *L. donovani* va se multiplier. Le passage du stade promastigote à celui d'amastigote est une des manifestations de la capacité du parasite à ressentir et s'adapter aux changements environnementaux.

A ce jour la forme promastigote peut être propagée en culture, néanmoins des études en laboratoire ont montré que les parasites ainsi maintenus perdent au fil du temps certaines de leurs caractéristiques dont leur virulence. De plus la transformation du stade promastigote à celui d'amastigote repose sur un mécanisme très complexe qu'il est difficile de mimer en culture. Des études récentes ont montré que les amastigotes obtenus en condition axénique sont différents, notamment en ce qui concerne la virulence, de ceux isolés à partir d'animaux ou de patients malades. Seuls quelques facteurs de virulence ont pu être mis en évidence, le plus souvent pour les espèces cutanées, et ne peuvent rendre compte à eux seuls de la pathologie.

Dans ce contexte, l'étude des mécanismes biologiques des *Leishmania* dont la recherche de facteurs de virulence pouvant à terme être utilisés en prophylaxie (ex vaccination) ou en thérapie (ex recherche de nouvelles cibles anti-parasitaire) reposent sur l'accès à des parasites ex-vivo et le recours à des modèles expérimentaux adaptés dont le hamster doré pour l'étude de la leishmaniose viscérale. En effet, le hamster, contrairement à la souris, présente une pathologie similaire à celle de l'homme infecté par *L. donovani*.

Les objectifs de ce projet consistent (1) à réaliser une étude de la virulence de parasites *L. donovani* LD1S fraîchement dérivés à partir de hamsters malades (p2) ou après entretien en culture (p20) afin de déterminer les doses de parasites minimales et néanmoins suffisantes pour l'établissement de la pathologie et de comparer in vivo à dose équivalente l'impact de la culture sur la pathologie, (2) à rechercher, par une approche génétique fonctionnelle in vivo, des facteurs de virulence impliqués dans la survie et la multiplication des parasites causant à terme la maladie et ceci dans un contexte biologique approprié, (3) à adapter in vivo des parasites *L. donovani* ou *L. infantum* provenant d'isolats de malades afin de préserver leur virulence et d'avoir accès à des amastigotes et (4) à transmettre notre savoir-faire concernant le modèle expérimental d'infection par *L. donovani* (hamster) à des chercheurs d'équipes nationales et internationales.

Le suivi régulier des animaux permettra d'apprécier l'évolution de la maladie dont un des symptômes est la perte de poids, la mesure de la charge parasitaire dans les organes cibles étant réalisée à l'issue de la procédure.

La réalisation de ce projet, sur une période de cinq ans, nécessite donc le recours à 232 hamsters dorés femelles. Compte-tenu de la nature qualitative des données attendues pour la recherche des

facteurs de virulence et des effets très marqués attendus pour l'analyse comparative de la virulence de souches de parasites p2 et p20, l'effectif proposé est considéré comme suffisant d'un point de vue statistique.

Les animaux seront hébergés par 2 à 3 individus et un enrichissement à base de coton et de sphères de plastique leur sera fourni. L'inoculation des parasites sera réalisée sur des animaux préalablement anesthésiés et le suivi régulier du poids, de l'apparition de lésions cutanées permettra de minimiser au maximum la sévérité des procédures. Au-delà d'une perte de poids maximale de 20% par rapport au poids maximum de chaque individu et/ou en présence de lésions cutanées au niveau du museau, les animaux seront mis à mort. Les 4 procédures impliquées dans ce projet sont classées en sévérité modérée.

12176 Depuis de très nombreuses années, des pullulations de campagnols causent des dégâts considérables dans les régions d'élevage (*Arvicola terrestris* et *Microtus arvalis*), céréalières (*Microtus arvalis*) ou d'arboriculture (*Microtus duodecimcostatus*), tout particulièrement en Auvergne. Les pullulations de campagnols sur prairies (*Arvicola terrestris* et *Microtus arvalis*) ont des conséquences directes sur la qualité et la quantité de l'herbe et des fourrages. Des enquêtes réalisées en Franche Comté indiquent des pertes annuelles de 30 à 80 % selon les parcelles.

En raison des dégâts occasionnés par les campagnols et du risque sanitaire potentiel (ces rongeurs peuvent héberger plus de 40 pathogènes pour l'homme) associé à leur pullulation, il est nécessaire de contrôler leurs populations. Ce contrôle repose sur des approches sanitaires, sur des pratiques agricoles adaptées et écologiques intégrées et sur l'utilisation de rodenticides. Parmi les rodenticides anticoagulants, seule la bromadiolone est homologuée en France pour cet usage. Malgré un contrôle strict de son usage, son utilisation en plein champ peut aboutir, en raison de sa très longue rémanence tissulaire, à des mortalités au sein de la faune sauvage prédatrice des campagnols, rapaces (milans, buses, chouettes, ...) ou mammifères (comme le renard et éventuellement le sanglier). De nouvelles molécules rodenticides efficaces et écocompatibles rapidement éliminées par les prédateurs naturels des campagnols sont donc nécessaires pour contrôler les populations de campagnols.

L'objectif de ce projet est de tester l'élimination et donc la sécurité de ces nouvelles molécules "campagnolicides". Un premier screening des molécules candidates a été effectué in vitro ce qui a permis d'écarter les molécules non actives. Un deuxième screening a été effectué in vivo sur campagnols terrestres pour vérifier l'efficacité et la rémanence courte des molécules sélectionnées lors du premier screening. Néanmoins, il est indispensable de s'assurer que les molécules sélectionnées soient également faiblement rémanentes chez le principal mammifère prédateur de campagnols : le renard. En l'absence de données sur l'équipement en enzymes métaboliques du renard, seule l'expérimentation in vivo chez cette espèce permettra d'apporter les réponses nécessaires.

Pour chaque molécule nous évaluerons la rémanence et la toxicité. La rémanence du produit chez le renard permettra d'estimer le risque d'intoxication lié à la consommation de plusieurs rongeurs intoxiqués. En effet, plus la rémanence chez le renard est grande, plus le risque d'atteindre le seuil toxique en consommant des petites doses qui s'accumulent est élevé. La toxicité (évaluée par la dose létale pour 50% des individus, DL50) des produits présentant la plus faible rémanence sera ensuite déterminée directement.

Pour avoir une puissance statistique suffisante, un test de rémanence est fait sur 6 animaux (3 mâles, 3 femelles) et la détermination de la DL50 sur 6 mâles et 6 femelles.

Les animaux seront hébergés dans les conditions satisfaisantes pour leur bien-être, l'enrichissement mis à leur disposition est régulièrement changé. Les manipulations seront effectuées par un personnel spécialisé et entraîné afin de limiter au maximum le stress. Des dosages des facteurs de la coagulation seront effectués pendant 1 à 2 mois après la distribution du produit à tester pendant l'étude de la rémanence et pendant 2 semaines lors de l'estimation de la DL50. Dès que les renards présenteront une perturbation de leur coagulation sanguine un traitement à la vitamine K1 sera institué. Ce produit est un antidote spécifique des molécules qui

seront étudiées, il permettra une guérison rapide et totale de l'animal. Les tests seront donc non létaux.

Pendant les 5 ans du projet, nous prévoyons de tester au maximum 10 produits, chaque test de rémanence nécessite 6 renards ; l'estimation de la DL50 ne sera faite que pour ceux dont la rémanence est courte, elle nécessite 12 renards. Le projet utilisera donc au maximum 180 renards si on ne tient pas compte d'une réutilisation possible des animaux.

12177 Les maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ces maladies.

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

Nous avons déjà la preuve de concept de notre stratégie dans des modèles murins pour les maladies neurodégénératives suivantes:

-La maladie d'Alzheimer : la surexpression de l'enzyme clé du métabolisme cérébrale du cholestérol à l'aide d'un vecteur (de type AAV) dans les régions précocement atteintes par la pathologie chez des souris modèles (amyloïde et tau) permet de restaurer les déficits mnésiques.

-La maladie de Huntington : La surexpression de cette même enzyme à l'aide d'un vecteur AAV permet de corriger les anomalies neuropathologiques et comportementales chez la souris modèle.

Le but final de l'étude est de compléter toutes les étapes précliniques avant de proposer cette approche thérapeutique chez les patients à un stade précoce de l'évolution de la maladie de Huntington.

Dont le premier objectif consiste à tester la surexpression de l'enzyme/protéine dans la maladie d'Huntington (MH) au moyen de différents vecteurs viraux ciblant distinctement différents types cellulaires du système nerveux (neurones, astrocytes, oligodendrocytes).

Le deuxième objectif consiste à tester dans un premier temps des nouveaux lots de vecteur dans le cadre d'études de toxicité chez les souris saines et dans un deuxième temps la réalisation d'études se rapprochant des conditions cliniques portant sur l'effet bénéfique potentiel du vecteur dans deux modèles murins pour la MH afin d'évaluer l'effet du traitement sur la neuropathologie et sur le comportement moteur).

Remplacement: Le recours aux modèles animaux est essentiel, car aucun type de culture cellulaire ou système synthétique ne permet à ce jour de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles. De plus, les souris Huntington sont bien caractérisées. Tous les vecteurs AAV et les préparations utilisées seront caractérisés in vitro avant leur utilisation chez l'animal. Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité dans des élevages agréés.

Raffinement: Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage/utilisation, et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe certifient le bien-être des animaux. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Réduction: Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. Leur nombre (860) a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider l'efficacité d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être considérée comme cible dans plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de virus à injecter et les temps d'analyses.

12178 Le projet, réalisé dans un cadre réglementaire et consistant en quatre procédures, a comme objectif d'évaluer les effets indésirables de produits sur des fonctions de reproduction et/ou sur le développement de la descendance ou d'animaux juvéniles, évaluation qui peut être requise par les autorités pour les demandes de mise sur le marché ou d'enregistrement de produits médicamenteux, chimiques, etc...

Ce projet se résume en l'administration répétée (quotidienne en général) d'un produit pharmaceutique, chimique, vétérinaire, etc... chez le rongeur pendant différentes phases du cycle de la vie: de la phase de pré-accouplement ou de la gestation au développement de la descendance (2e ou 3e génération), ou pendant le développement et la croissance d'animaux juvéniles jusqu'à leur âge adulte potentiellement. La voie d'administration est généralement soit celle prévue chez l'homme (produit pharmaceutique), soit orale (produit chimique).

Le rat est l'espèce recommandée par les autorités internationales et couramment utilisée dans les études de toxicologie, mais la souris peut aussi être utilisée. Le nombre d'animaux utilisés au maximum dans ce projet est estimé à 39684 (dont 36764 petits nés dans les études, tenant compte d'une moyenne de 13 petits nés par portée). Le nombre d'animaux traités par groupe/sexe (permettant d'obtenir des résultats robustes et d'atteindre les objectifs des études) et les doses initiales utilisées (choisies en vue d'éviter toute toxicité excessive) suivent les recommandations des lignes directrices OCDE, FDA ou ICH.

L'hébergement des animaux est en groupe ou en individuel ; ce dernier permet de protéger les gestations et portées et d'empêcher les agressivités entre males, et est aussi recommandé pour certaines voies d'administration (expl: voie dermale pour éviter la contamination entre animaux et garantir la dose administrée sur la peau). Les dimensions des cages sont conformes à la Directive 2010/63 et une attention particulière est apportée à l'enrichissement environnemental.

Lors des études, l'état de santé des animaux est contrôlé régulièrement (observation des animaux et enregistrement des signes cliniques tous les jours, suivi poids corporel et consommation alimentaire au moins une fois par semaine) et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter tout inconfort ou souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance de l'animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptable. Des examens non invasifs sont réalisés en cours d'étude. Des analyses hématobiochimiques et/ou urinaires peuvent être réalisées, ainsi que de la toxicocinétique, et une anesthésie peut être faite avant les prélèvements de sang selon la méthode utilisée. Des prélèvements d'organes pour analyse histopathologique ou des paramètres de sperme sont réalisés à l'euthanasie.

Les volumes d'administration des produits et les volumes de prélèvements sanguins sont en accord avec les recommandations EFPIA/ECVAM.

Il n'existe pas de méthode alternative in vitro pour ces types de procédure en raison de la complexité que représentent un organisme vivant et celle des processus de développement des concepts et des échanges dynamiques entre mère et descendance.

12179 La maladie d'Alzheimer (MA), une maladie neurodégénérative chronique, représente la cause la plus fréquente de démence chez les personnes âgées. Cette maladie est entre autre causée par la formation de plaques amyloïdes.

Parmi les nombreuses molécules présentes dans le cerveau, 2 d'entre elles nous semblent intéressantes : la protéine sAPPalpha qui est un facteur de croissance neuronal et a un rôle neuroprotecteur et la protéine ApoE2 qui est connue pour diminuer le déclin cognitif dans cette maladie.

Notre objectif est de développer une nouvelle approche thérapeutique dans la MA visant à surexprimer ces deux protéines, en utilisant comme véhicule des cellules sanguines des souris (CSH). Ces cellules peuvent en effet être génétiquement modifiées ex vivo pour exprimer un gène thérapeutique. Elles peuvent être ensuite réinjectées chez l'animal (modèle de la MA), après un traitement qui détruit la moelle, laissant ainsi la place au cellules qui seront injectées de reconstituer

le système hématopoïétique des animaux hôtes et après passage de la barrière avec le cerveau, pourront se différencier pour exprimer la protéine sAPPalpha ou la protéine APOE2.

Ce projet a pour but d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette approche dans la MA. L'évolution de la neurodégénérescence sera évaluée par l'évolution comportementale des animaux.

Remplacement : nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris) car aucun modèle in-vitro ou de culture cellulaire ne permet aujourd'hui d'étudier les symptômes de perte de mémoire typiques de cette maladie. De plus, la souris est un modèle de MA bien caractérisé tant d'un point de vue comportemental que biologique (marqueurs histologiques ou moléculaires) pour évaluer le bénéfice thérapeutique associé à notre approche. Pour ce faire, nous utiliserons au maximum 4 modèles de MA déjà décrits.

Raffinement : En cas d'observation de la moindre douleur ou d'inconfort, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, après consultation du concepteur et du vétérinaire. Si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Réduction : enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques fiables. En effet, des travaux précédents ont permis de montrer que l'étude de groupes de 15 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs en comportement, ainsi que dans les analyses biochimiques et de biologie moléculaire, réalisées sur de petits échantillons (1 hippocampe / souris). De plus, ce nombre d'animaux prend en compte la mortalité spontanée, ayant cours du fait du phénotype, et de l'âge des souris, allant jusqu'à 14 mois. Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 285 souris.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés dans des établissements reconnus. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux.

12180 L'objectif de l'étude est de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans remodelage du myocarde auriculaire induit par un stress métabolique et qui favorise la survenue d'arythmie. Le but est de mieux comprendre la physiopathologie des arythmies auriculaires et d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques. Des travaux récents indiquent un lien entre obésité, l'accumulation de tissu gras cardiaque et la survenue d'arythmie. L'objectif du projet de recherche est de comprendre les mécanismes fondamentaux qui relie l'obésité et le développement de mécanisme biologique induisant l'arythmie. Notre hypothèse est celle d'une altération du métabolisme du myocarde auriculaire lors de l'obésité ou d'un stress métabolique qui entraîne des changements de propriétés fonctionnelles et de sa composition, notamment l'accumulation de la fibrose, acteur clé de l'arythmie. L'obésité peut être induite chez le murin en le soumettant à un régime riche en acide gras (High Fat Diet, HFD). Cette approche expérimentale sera reproduite chez le murin qui présente un métabolisme myocardique plus proche de l'homme. Une série d'animaux sera aussi soumise à un traitement d'un agent bradychardisant afin d'étudier l'impact de la fréquence cardiaque sur le métabolisme du myocarde.

Les rats et les souris seront soumis à un régime riche en gras (60%) pendant 4 mois, durée nécessaire pour observer un remodelage auriculaire. La vulnérabilité aux arythmies sera étudiée en délivrant des stimulations auriculaires à l'aide d'une sonde œsophagiennes introduite chez un animal anesthésié.

1. L'étude des propriétés fonctionnelles des oreillettes se fera, in vitro :

- Par l'enregistrement des potentiels d'action cellulaire du myocarde auriculaire à l'aide de la technique de microélectrode. Différents agents pharmacologiques seront utilisés pour disséquer les courants ioniques impliqués dans les modifications des potentiels d'actions auriculaires.

- Le métabolisme myocardique sera étudié par la mesure du ratio énergétique ATP/ADP et par l'étude de la respiration mitochondriale enregistrée dans le tissu myocardiques.

2. La régulation des composants du métabolisme du myocarde (métabolites) et les lipides sera étudiée sur le tissu du myocarde atriale, in vitro, par une approche « dite métabo-lipidomique » utilisant un spectromètre de masse.

Nous utiliserons au maximum 200 rats Wistar et 500 souris C57BL/6JRj en 5 ans.

Dans nos protocoles et analyses, nous prendrons les mesures suivantes pour appliquer la règle des trois R :

1- Les animaux seront pesés tous les mois, afin de s'assurer de la bonne prise de poids. A 2 et 4 mois, une ECG sera réalisée afin de vérifier les fonctions cardiaques de l'animal. Les animaux mis sous régime HFD et d'une molécule bradycardisante, seront susceptibles de développer des lésions aux coussinets, un pelage plus gras et une difficulté à se déplacer. Afin de prévenir l'inconfort de l'animal, la souffrance et la douleur ; une surveillance quotidienne sera effectuée pendant laquelle un tableau de score permettra d'évaluer les points limites : -lésion cutanée, -incapacité à se déplacer, -toiletage et -posture de l'animal. De manière globale, le comportement et l'aspect physique et expression faciale seront analysés. Dans le cas où un de ces points limites est atteint, nous agirons en première intention par la modification de la fréquence du change de la litière, mais aussi de sa nature. En seconde intention, nous réduirons la durée de l'étude et utiliserons des procédures d'euthanasie appropriées afin de réduire la souffrance.

2- En ce qui concerne l'étude du métabolisme atrial par l'effet du régime HFD, au moment du sacrifice, le prélèvement de sang (0.4ml max) sera réalisé sur la veine latérale de la queue de rat et de souris à différents temps (0.1ml de sang prélevé par temps) sur le même animal. Cela permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires par 5 et de mesurer à la fois l'efficacité et la concentration plasmatique de la protéine cible.

3- Chez le rat et la souris, la molécule bradycardisante est administrée à des doses bien définies par ajout dans l'eau. Une surveillance quotidienne sera effectuée pour s'assurer de la consommation de l'animal afin de palier à une éventuelle déshydratation. Les points limites seront la posture, la rigidité de la peau et l'expression faciale. Dans le cas où un des points limites est atteint, l'animal sera retiré de l'étude et euthanasié afin de réduire la souffrance.

4- Concernant les tissus, nous prélèverons les oreillettes, les ventricules et le foie des animaux contrôles mis sous régime normal (normal diet, ND), des animaux ND + molécule bradycardisante, des animaux HFD et des animaux HFD + molécule bradycardisante, pour extraire les lipides, métabolites, ARN messagers (ARNm) et les protéines. Nous pourrions ainsi constituer une banque pour des analyses postérieures qui permettront une caractérisation de nos modèles de remodelage auriculaire et qui pourra être utilisée par d'autres équipes pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter l'insuffisance cardiaque.

12181 Etat de l'art : Le syndrome métabolique, regroupant un ensemble de pathologies incluant le diabète type 2 (DT2), l'obésité, la stéatose hépatique non alcoolique, l'hypertension artérielle..., est une pathologie émergente, constituant un problème de santé publique majeur, aux conséquences préoccupantes. En effet l'approche thérapeutique actuelle présente de réelles limites où les effets curatifs sont peu convaincants. De plus ce syndrome est une menace de pandémie catastrophique pour les années à venir. Ainsi d'ici 30 ans, l'organisation mondiale de la santé estime que 60 millions d'européens seront diabétiques (contre 28 millions aujourd'hui), et que 4 personnes sur 5 seraient concernées par l'obésité et le surpoids. Les causes principales de décès de ces personnes atteintes par l'une des pathologies composant le syndrome métabolique sont les complications vasculaires (athérosclérose, anévrisme, accident vasculaire cérébral ou infarctus du myocarde). Dans nos études précédentes in vivo, in vitro et cliniques, nous avons montré que le syndrome métabolique et en particulier le DT2 est synonyme d'un vieillissement accéléré de l'aorte. Ainsi il existe un remodelage des structures composant la paroi du vaisseau, et notamment une dégradation précoce et accélérée des fibres élastiques, pouvant expliquer les complications vasculaires susmentionnées mais amplifier également le syndrome métabolique, formant ainsi un cercle vicieux.

Objectif : La restauration de la structure de la paroi du vaisseau en particulier des fibres élastiques et de leur fonction (compliance, résilience...) est un élément majeur pour réduire les complications

vasculaires mais aussi la progression du syndrome métabolique. Aujourd'hui, aucune étude et aucun traitement n'ont été décrits pour limiter la dégradation et/ou stimuler la néo-synthèse de ces fibres élastiques. Le présent projet vise à évaluer l'action de molécules à visée thérapeutique sur l'architecture de la paroi vasculaire et les conséquences vasculaires et métaboliques associées. Aujourd'hui aucune méthode de substitution ne peut remplacer l'utilisation de l'animal pour observer les effets escomptés de ces molécules.

Méthodologie : Nos tests *in vitro* préalables, nous ont permis de réaliser une sélection de 7 traitements à visée thérapeutique (détermination des concentrations efficaces et non toxiques) pouvant répondre à notre objectif. Dans ce projet de 5 ans, nous testerons ces molécules afin de tenter de réverser le phénotype de deux modèles murins DT2 (génétique et nutritionnelle du DT2, sévère et modéré, respectivement), à savoir une réduction des altérations métaboliques et/ou vasculaires, sans dommage escompté. Ainsi des tests évaluant la régulation de l'homéostasie du glucose et de la fonction vasculaire (non invasifs) seront effectués chez l'animal vigile afin d'être au plus proche des conditions physiopathologiques. Ces tests sont utilisés en routine en clinique vétérinaire et/ou humaine et leur points limites ont été définis sur les connaissances bibliographiques et l'expérience propre du laboratoire. D'autres approches se feront *post-mortem* afin d'appréhender et optimiser au mieux les mécanismes moléculaires impliqués et de réduire les approches expérimentales *in vivo*. Afin de réduire le nombre d'animaux, plusieurs approches seront réalisées sur les mêmes animaux, de façon séquentielle et planifiée. Des temps de latence entre chaque test seront nécessaires pour 1- le bien-être animal 2- pour permettre de rationaliser les résultats de chaque procédure entre eux. Enfin toujours dans le but de réduire le nombre d'animaux, de nombreuses méthodologies seront réalisées *post-mortem* à partir d'un même tissu (biochimie, microscopie, biologie moléculaire...), quand le protocole expérimental est possible. De plus une étude statistique préalable a été réalisé selon les recommandations liés au bien-être animal afin de minimaliser le nombre d'animaux. Ainsi le nombre maximal pour cette étude se déroulant sur 5 ans, sera de 1000 souris réparties en 2 procédures comprenant 8 groupes (7 traitements + groupe témoin). Durant le déroulé du protocole, les animaux seront placés dans un milieu enrichi et en présence de plusieurs congénères. Afin de limiter le stress et l'anxiété lors de ces procédures, une habituation à la contention et aux matériels est prévu. Les 2 procédures indépendantes et les protocoles expérimentaux seront planifiés en accord avec les responsables de l'animalerie et de la place disponible afin d'obtenir les conditions optimum d'hébergement des animaux.

Conclusion : Le DT2 et ses principales complications, au premier rang desquelles les maladies cardio-vasculaires, représentent un problème majeur de santé publique dans le monde. Le rétablissement de l'architecture de la paroi vasculaire par l'administration de molécules à visée thérapeutique permettrait rétablir une physiologie normale du tissu et limiter alors les complications cardiovasculaires associées au DT2.

12182 Chez l'ensemble des vertébrés, les macrophages sont les premières cellules du Système Immunitaire (SI) à être différenciées au cours du développement embryonnaire. Ces cellules sont générées très tôt et se dispersent dans les tissus pour y accomplir leurs fonctions de protection face aux infections et d'élimination des débris cellulaires. Ceux de ces macrophages qui colonisent le Système Nerveux Central (SNC) s'y différencient en microglie, par l'acquisition d'une morphologie très ramifiée et une diminution du comportement migratoire. Ces cellules sont – pendant toute la durée de la vie – les seuls représentants du SI dans le cerveau et sont essentielles pour le bon fonctionnement du SNC, et leur dérèglement est impliqué dans de nombreuses pathologies humaines, souvent dégénératives, comme les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson.

Au vu même de sa fonction de protection de l'organisme face aux infections, inflammations, blessures, le système immunitaire ne peut être étudié hors de son contexte tissulaire sans être profondément altéré. Notre étude des mécanismes de déploiement du SI dans les tissus et son maintien en conditions physiologiques est un projet qui nécessite d'étudier les cellules dans leur contexte biologique et de faire appel à un modèle animal.

Notre équipe utilise les atouts optiques (développement externe, transparence des tissus) des stades précoces de développement (de la naissance à 11 jours) du poisson modèle « zebrafish »

(*Danio rerio* ou danio zébré) pour étudier par des techniques d'imagerie *in vivo* ces différentes étapes de l'établissement des populations de macrophages tissulaires : migration, invasion, survie, maintien dans les tissus et/ou renouvellement. Ces points-clés du développement du système immunitaire sont difficiles à aborder chez les mammifères et les caractéristiques de notre modèle nous permettent d'effectuer la plupart des études par imagerie complètement non-invasive, de n'avoir aucun recours à la chirurgie et de limiter le nombre d'animaux nécessaires aux expériences (le suivi et l'observation des mêmes animaux au cours du temps sont possibles). Notre démarche expérimentale consiste donc à utiliser le zebrafish comme alternative aux modèles mammifères, et à vérifier ensuite en culture cellulaire que les mécanismes identifiés sont conservés chez les mammifères.

Ce projet sur 5 ans nécessitera au maximum 678 poissons (mâles et femelles indifféremment) ; mais les résultats obtenus seront analysés en temps réel et les procédures pourront être arrêtées dès que des conclusions concordantes et statistiquement significatives seront tirées – nous permettant peut-être d'utiliser moins d'animaux. Nous étudierons des poissons « normaux » comme contrôles et des poissons qui présentent des altérations de l'établissement des populations de macrophages tissulaires (problème de production, de dispersion dans les tissus, de fonction, de survie, de renouvellement etc) - ces altérations ne générant ni stress, ni douleur, ni souffrance, ni dommages chez les jeunes poissons aux stades d'intérêt observés.

Notre projet comprend 3 procédures de sévérité légère (1 impliquant une imagerie rapide requérant 192 larves, 1 impliquant une imagerie longue requérant 432 larves et 1 impliquant une imagerie précédée d'un traitement pharmacologique requérant 54 larves). L'imagerie sera toujours réalisée sous anesthésie et les procédures n'occasionneront pas d'effet néfaste sur les animaux.

Les poissons seront hébergés dans les conditions réglementaires satisfaisant aux exigences de leur espèce et de leur bien-être. Ils feront l'objet d'un suivi quotidien rigoureux de façon à identifier tout signe clinique anormal et à les mettre à mort par la méthode réglementaire si les points limites définis sont atteints. Tous les poissons inclus dans le projet seront mis à mort à l'issue des procédures selon la méthode réglementaire.

L'ensemble des résultats obtenus nous permettra d'éclairer les mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes de mise en place et de maintien de ces populations de macrophages résidents, ainsi que de comprendre leurs rôles et modes de fonctionnement en conditions homéostatiques et pathologiques.

12183 Ce projet s'intéresse aux rôles de la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) neurotransmetteur du système nerveux central. Ce neurotransmetteur est associé à de nombreuses pathologies psychiatriques, anxiété, dépression, suicide, troubles psychotiques et bipolaires. Ces troubles psychiatriques sont souvent associés à des anomalies du sommeil. Nos études utilisent plus spécifiquement comme outil un des 15 récepteurs cibles de ce neurotransmetteur, le récepteur 5-HT_{2B}. Nous avons montré qu'une mutation de ce récepteur chez l'homme, était associée à une impulsivité excessive, des comportements psychotiques et une tendance accrue au suicide. Le but de nos travaux actuels est donc de valider ces données chez la souris afin de comprendre plus en détail les fonctions cérébrales contrôlées par ce récepteur et ainsi d'en comprendre les pathologies associées, impulsivité, ou comportement psychotique en relation avec les processus inflammatoires. Nous prévoyons de valider les phénotypes observés après l'élimination de l'expression totale à ceux consécutifs à une invalidation locale de ce récepteur 5-HT_{2B}, soit dans les neurones qui produisent la sérotonine, soit les macrophages résidents du cerveau, ou cellules microgliales. Ces souris mutantes sont analysées dans une série de tests comportementaux afin d'évaluer les modifications comportementales éventuelles induites après élimination locale de ces récepteurs, en particulier sur la régulation du sommeil et de la mémoire. Seules les souris génétiquement modifiées permettent d'étudier le rôle de gènes particuliers dans la physiopathologie des troubles psychiatriques et des anomalies du sommeil qui les accompagnent. À l'heure actuelle, de nombreux aspects des troubles du sommeil et de la mémoire ont pu être modélisés chez le rongeur. Le nombre d'animaux mis en jeu lors de nos expériences de tests comportementaux (672). En application de la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement), nous avons réduit ce

nombre au strict minimum nécessaire à atteindre la puissance statistique requise. Afin de restreindre encore la quantité, les animaux sont utilisés pour une série consécutive de plusieurs de test lorsque l'impact d'un premier test n'intervient pas sur les tests subséquents. De plus notre stratégie expérimentale permet de ne soumettre chaque lot d'animaux qu'à une seule privation de sommeil. Nous réduirons au maximum l'inconfort des souris car les procédures que nous mettrons en œuvre sont bien établies et n'induisent pas de douleur d'angoisse ou de stress, et nous appliquerons des soins pré- et post-opératoires quand cela sera utile. Remplacement - Il n'existe pas de méthode alternative fiable pour enregistrer le sommeil ou la mémoire des animaux. Nous serons néanmoins vigilants quant au développement de méthodes alternatives pendant la durée de ce projet.

12184 Chez les patients immunocompétents, l'infection par le toxoplasme est le plus souvent asymptomatique mais elle peut être à l'origine de toxoplasmose fœtale grave si l'infection survient au cours de la grossesse ou chez des personnes immunodéprimées. Ces formes cliniques graves de toxoplasmose sont actuellement traitées par une combinaison de pyriméthamine et de sulfadiazine, ces deux médicaments doivent être administrés pendant plusieurs semaines et peuvent être à l'origine d'effets secondaires importantes.

L'objectif de notre projet est de tester, *in vivo*, l'efficacité de trois composés présentant des propriétés anti-toxoplasmique *in vitro*. Après des expériences en culture cellulaire, nous avons sélectionné ces 3 composés parmi une centaine de molécules approuvées par la Food and Drug Administration (FDA). Ces trois composés ont tous été testés et publiés en modèle animal pour traiter d'autres maladies et deux des composés, que nous souhaitons évalués, sont actuellement testés cliniquement comme anti-cancéreux.

Tout d'abord, nous souhaitons tester leur efficacité au cours d'une toxoplasmose aiguë, pour confirmer l'activité anti-toxoplasmique que nous avons observé *in vitro*. En fonction des résultats, une expérience de suivi de l'infection grâce à des parasites mutés sera réalisée par une technique d'imagerie lors du traitement des souris par ces composés. De plus, nous réaliserons des parasites mutés pour la cible de ces composés et confirmerons *in vivo* la résistance de ces parasites sous traitement.

Le ou les composés efficaces, pour traiter l'infection aiguë *in vivo*, seront utilisés pour traiter une infection chronique, pour laquelle il n'existe pas de médicaments efficaces. En effet, aucun médicament ne permet d'éradiquer les kystes de toxoplasme.

Les modèles d'infection aiguë et chronique seront obtenus par l'infection de souris CBA adultes soit avec une souche virulente de *Toxoplasma gondii* (souche RH, type 1) soit avec une souche kystogène et non-virulente (souche 76K ou PRU, type 2), l'infection parasitaire est réalisée par une injection intrapéritonéale et les traitements seront administrés per os par gavage durant 3 à 7 jours consécutifs en fonction des molécules.

Nous souhaitons donc avec ces expériences:

1/ Confirmer l'efficacité de ces 3 composés (A, B, C) au cours de la toxoplasmose aiguë et chronique: représentent-ils de réels candidat médicaments ?

2/ Comparer leur efficacité à la sulfadiazine (200mg/kg) qui est un médicament anti-toxoplasmique efficace.

3/ Confirmer *in vivo* la cible moléculaire de ces composés.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des "3R" :

- "remplacer" : les 3 composés candidat médicaments ont été testés lors de l'infection par *T. gondii* en modèle cellulaire humain : ils sont parasitocides *in vitro*. Nous souhaiterons le confirmer dans un modèle de toxoplasmose murine. En effet, il ne sera possible d'envisager leurs administrations chez l'homme pour traiter une toxoplasmose que si des études précliniques ont été réalisées chez l'animal.

- "réduire": la première expérience sera réalisée sur 2 à 3 animaux par condition à tester (13 souris pour cette expérience initiale). L'objectif étant que ces composés doivent être totalement efficaces,

les expériences suivantes ne seront réalisées qu'en cas de survie des souris traitées avec les composés testés lors de cette première expérience (100% de survie). De plus, les contrôles sont mutualisés puisque les 3 composés sont testés en parallèle. La confirmation de l'efficacité de ces composés par cette expérience initiale conduira à la réalisation de deux autres expériences qui seront réalisées sur 2 à 5 animaux/condition à tester.

- "Raffiner": les animaux seront hébergés dans un établissement utilisateur agréé par du personnel formé, ils seront en groupe, en cages avec enrichissement du milieu de vie et leur bien-être sera contrôlé. Des points limites ont été définis, les souris seront euthanasiées dès l'apparition des premiers signes cliniques de toxoplasmose (souche virulente), et des antalgiques seront administrés aux animaux infectés par une souche chronique. La méthode de mise à mort des animaux est règlementaire. Les 3 composés testés ne sont pas toxiques et ils seront mélangés pour leur administration à des excipients (véhicule) classiques (polyéthylène glycol ou carboxyméthylcellulose).

Pour l'expérience d'imagerie réalisée dans une autre animalerie, les animaux seront transportés dans des conditions optimisées en limitant le stress secondaire au transport.

106 souris max seront utilisées pour ce protocole en fonction des résultats de la première expérience (13 souris).

12185 L'objectif de cette étude est d'étudier la cognition sociale et le lien avec les capacités à communiquer chez une espèce d'oiseau chanteur: l'étourneau sansonnet.

Les étourneaux sansonnets utilisés lors de cette étude seront 22 mâles et 22 femelles sauvages ainsi que 50 jeunes oiseaux mâles et femelles élevés des conditions sociales contrôlées. Les étourneaux sauvages constituent deux lots par sexe. Un lot élevé dans des conditions non enrichies (N=11 par sexe) en volière intérieure (2mx1mx2m) équipée de perchoirs et bénéficiant de soin classique de nourrissage et nettoyage de la cage. Le second lot est un lot dit « enrichi » (N=11 par sexe). Les oiseaux sont placés dans une large volière extérieure (>130m²) et bénéficiant donc d'un vaste espace de pelouse, d'un abri, de perchoirs, ainsi que de nombreux compagnons sociaux. Lors des tests expérimentaux, chaque oiseau sera placé individuellement dans une cage. Trois séries de tests seront réalisés : test d'attention visuelle sociale, test d'attention visuelle non sociale et test d'attention auditive sociale. Chaque test dure 2 minutes et est répété 4 fois sur 2 jours soit une fois par demi-journée. Les tests se déroulent donc sur une période de 6 jours. Nous chercherons ainsi à déterminer si les étourneaux sansonnets élevés dans des conditions différentes expriment des comportements d'attention différents et si ces compétences attentionnelles peuvent être reliées à d'autres caractéristiques sociales, notamment les capacités à communiquer. Ce protocole est prévu pour répondre à la règle des 3R. Remplacer : l'objectif de cette étude est de connaître les capacités d'attention chez l'oiseau. Mener les expériences sur des modèles vivant est donc nécessaire. Réduire : le nombre d'oiseaux utilisés ici est le moins d'animaux strictement nécessaire pour réaliser cette étude et pour pouvoir effectuer des tests statistiques. Raffiner : La durée des tests est limitée au maximum soit deux jours par tests donc 6 jours au total. Sur ces 6 jours les oiseaux seront sollicités un par un quelques minutes. Entre les tests, les oiseaux pourront se voir et s'entendre.

12186 Les neuropathies périphériques, dont font partie les maladies de Charcot Marie Tooth (CMT), touchent environ 700 000 personnes en France. Il existe à l'heure actuelle aucun médicament efficace pour ces pathologies. Les maladies de CMT ont une origine génétique et résultent de mutations ou de duplications d'une partie de l'ADN sur des gènes cibles. Nous étudions au laboratoire la maladie de Charcot Marie Tooth de type 1A (CMT1A) qui implique une duplication du gène PMP22 et qui touche en France environ 30 000 personnes. La maladie CMT1A se manifeste par une force musculaire diminuée et une atrophie des muscles des jambes qui freinent la locomotion et, plus tardivement, d'atteintes des membres supérieurs. Ce projet expérimental répond à la règle des 3R. Remplacer: l'étude de cette pathologie est rendue difficile par un accès limité des neurones chez les patients atteints et les modèles cellulaires ne permettent pas de mimer les atteintes neurologiques des patients. Le recours à des modèles animaux est donc indispensable

aux études visant à mieux comprendre la physiopathologie de la maladie CMT1A et à développer des stratégies thérapeutiques efficaces. Le modèle rongeur est particulièrement adapté à la production d'animaux génétiquement modifiés. Dans ce projet, nous allons utiliser une lignée de rats transgéniques hétérozygotes surexprimant le gène PMP22 (rats CMT). Ces animaux reproduisent fidèlement la physiopathologie de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A. Ils constituent de ce fait un excellent modèle préclinique dans la recherche de traitements pharmacologiques spécifiques. Ce projet expérimental vise à maintenir la lignée de rats CMT au sein de l'animalerie. Ce projet expérimental utilise au maximum 30 rats sur une période de 5 ans (soit 6 animaux par an) et répond aux exigences de la règle des 3R, à savoir :

- Remplacer : Les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse d'un organisme entier suite à l'administration d'une substance potentiellement thérapeutique. Les modèles animaux restent par conséquent couramment utilisés lors des études précliniques et cliniques. Le modèle du rat transgénique CMT est à ce jour le meilleur modèle expérimental de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A. Il n'existe par conséquent pas de solution alternative à l'utilisation de ces animaux.

- Réduire : L'entretien de la lignée sera assuré à partir d'un faible nombre d'animaux reproducteurs (à savoir 2 couples de rats : 2 sauvages et 2 rats CMT hétérozygotes). Sur une durée de 5 ans, le nombre maximum de rats utilisés sera de 30. Les descendants générés par ses accouplements seront utilisés dans les projets de recherche ultérieurs de l'équipe.

- Raffiner : Le phénotype des rats CMT hétérozygotes est peu dommageable (atteintes musculaires et nerveuses légères, ne permettant pas de les distinguer de rats normaux à l'œil nu). La gravité est par conséquent modérée. Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'unique prélèvement de tissu sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux sous anesthésie générale et locale.

12187 Les maladies auto-immunes résultent d'un dysfonctionnement du système immunitaire le conduisant à s'attaquer aux propres constituants de l'organisme. Elles sont d'origine à la fois génétique, environnemental (agents infectieux, agents toxiques, médicaments) et hormonal. Plus de 80 maladies auto-immunes sont décrites à ce jour dont l'étiologie reste essentiellement inconnue. Elles représentent la 3ème cause de morbidité dans les pays développés et affectent 5 à 7% de la population. Une meilleure compréhension de leur physiopathologie est nécessaire pour améliorer le traitement des patients. Le lupus érythémateux disséminé/systémique (LED) est une maladie auto-immune chronique responsable de destructions tissulaires multiples (peau, reins, poumons). Bien que de nombreuses anomalies de l'immunité aient été caractérisées, la physiopathologie du LED reste mal connue car complexe. Les souris de cette étude constituent un modèle exceptionnel de la maladie humaine puisqu'elles développent spontanément des atteintes cutanées, pulmonaires, rénales et articulaires dues à des infiltrats lymphoïdes et des titres élevés en auto-anticorps. Ces derniers sont responsables de glomérulonéphrites qui sont la complication la plus grave du LED. Ces souris présentent aussi des taux sériques anormalement élevés de cytokines ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude de l'implication des cytokines dans le développement du LED. Comme dans l'espèce humaine, ces souris présentent un fort dimorphisme sexuel, les femelles étant plus touchées que les mâles. La sévérité des atteintes tissulaires du LED est actuellement contrôlée par des corticoïdes et des immunosuppresseurs. Cependant, leur utilisation au long cours altère les réponses immunitaires engendrant un risque infectieux important pour le patient. Les effets secondaires de ces médicaments incitent à rechercher de nouveaux traitements. Cette lignée de souris est un modèle unique pour évaluer l'efficacité de nouveaux traitements ainsi que leurs mécanismes d'action car il est actuellement impossible de reproduire *in vitro*, ou même *ex vivo*, la complexité des interactions cellulaires à l'œuvre lors des réponses immunitaires. Le but de notre projet est 1) d'analyser les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables des processus inflammatoires physiologiques et pathologiques dans un modèle de

souris développant spontanément un LED ; 2) de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques de cette pathologie (études précliniques). Chaque groupe expérimental est constitué de souris âgés de 8 à 28 semaines ce qui permet de couvrir les différents stades de développement du LED. Afin de respecter la règle des trois R, les expériences prévues dans ce projet ont été optimisées dans une expérience pilote réalisée précédemment afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et de raffiner leur suivie au cours des expériences. Ainsi, le nombre total d'animaux utilisé pour ce projet sera de 720 compte-tenu de la variabilité des réponses immunitaires individuelles et comprendra des souris mâles ou femelles âgées de 6 à 28 semaines soit avant et après l'apparition du LED. Ce nombre d'animaux garantira la valeur statistique des résultats obtenus. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, l'évolution du LED sera suivie par imagerie in vivo qui est une méthode non destructive, non invasive et non traumatique. Afin de raffiner l'expérience, les souris seront anesthésiées lors des prélèvements sanguins. Le suivi clinique des souris sera réalisé quotidiennement et il sera renforcé avec le développement de la maladie. Elles seront mises à mort en cas de perte de poids supérieure à 15%. Comme il existe un fort dimorphisme sexuel dans le développement de la maladie, nous utiliserons à part égale des mâles et des femelles. Ce projet permettra un meilleur traitement des maladies auto-immunes de type lupique.

12188 Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) sont des maladies neurodégénératives à l'issue toujours fatale qui affectent l'homme et certains animaux. Suite à l'épisode de la vache folle, l'interdiction totale des farines animales s'est imposée comme la seule mesure susceptible d'enrayer l'épidémie d'ESB (encéphalopathie spongiforme bovine) en Europe. Cette mesure a protégé les populations d'animaux de rente de la propagation des agents des EST et stoppé l'épidémie. Mais la question de la ré-introduction de ces farines pour l'alimentation animale soulève de nombreuses questions économiques, écologiques, éthiques mais surtout sanitaires. Comme il n'existe que peu ou pas de travaux fiables sur la capacité des prions à se propager chez le poisson, cette utilisation chez les poissons apparaît comme un pari risqué. Il semble donc urgent d'objectiver la sensibilité de ces espèces et/ou leur capacité à participer à l'exposition des consommateurs aux prions. Le développement d'un nouveau modèle animal tel que le poisson zèbre permettrait de compléter les connaissances fondamentales acquises avec l'utilisation des lignées de souris transgéniques et autres mammifères quant à la physiopathologie et la neuropathologie des EST.

Les EST sont le résultat d'un désordre protéique caractérisé par l'accumulation d'une protéine normale (la protéine prion cellulaire, ou PrPC) sous une forme pathologique (la protéine prion «Scrapie» (tremblante en anglais), ou PrPSc) dans le système nerveux central. La protéine PrPSc est le constituant essentiel de la particule infectieuse. Par ailleurs, la présence de la PrPC s'est avérée indispensable pour le développement de l'infection et de la maladie et son expression dans les cellules nerveuses nécessaire à la manifestation des phénomènes de dégénérescence associée. La protéine prion est présente chez les mammifères (y-compris les mammifères marins), les amphibiens, les oiseaux, et les poissons.

A ce jour des tentatives d'infections expérimentales de poissons par des prions ont plusieurs fois été menées, dans le but d'évaluer si l'alimentation de ces animaux par des farines animales potentiellement contaminées par des prions pouvait permettre la transmission de cette pathologie aux poissons. Ces tentatives sont pour le moment sans succès apparent. Nous avons créé deux lignées de poissons transgéniques exprimant une protéine prion de mammifère (le poisson zèbre (*Danio rerio*) est une espèce bien adaptée pour des études de physiopathologie affectant le développement et le tissu nerveux central. L'utilisation du poisson zèbre se généralise grâce aux nombreux outils d'imagerie et de génétiques associés) :

- Les poissons de la première lignée génétiquement modifiée seront infectés expérimentalement (après sédation) par un agent prion mammifère.
- Les poissons de la seconde lignée possèdent une mutation qui devrait conduire au développement spontané de la maladie.

Si la pathologie se développe, nous pourrions alors étudier en détail la physiopathologie, la neuropathologie et la transmissibilité de ces EST. Dans le cas contraire, il sera intéressant d'analyser l'origine de cette résistance.

Le projet présenté ici s'inscrit dans la continuité d'une précédente demande d'autorisation de projet (DAP) qui concernait l'établissement de ces lignées de poissons transgéniques ainsi que l'évaluation de leur sensibilité à l'infection avec des prions. Ce protocole n'avait cependant pas anticipé le nombre de générations nécessaires afin de stabiliser l'expression du transgène au sein de la population. De plus, le niveau d'expression de ces transgènes est relativement faible, ce qui se traduit (d'après ce que l'on connaît des modèles souris) par un allongement considérable des temps d'incubation de la maladie ; à expiration de la précédente DAP, les animaux ne présentent toujours pas de signes d'une incubation de la maladie. La DAP suivante doit donc proposer des protocoles expérimentaux sur des temps plus longs et utilisant des doses infectieuses plus importantes.

Ce projet a pour but de terminer l'expérimentation en cours, dont le délai d'autorisation est expiré. En fonction des résultats obtenus, et après optimisation de la dose inoculée (100 poissons nécessaires), l'équipe pourra envisager d'utiliser 500 poissons en deux procédures :

- pour la première procédure (400 poissons), les animaux (transgéniques et contrôles) seront répartis en huit lots de 50 animaux, infectés avec 2 souches différentes de prions (on ne connaît pas a priori le degré de sensibilité du zebrafish transgéniques vis à vis de ces pathogènes de mammifères) inoculés après anesthésie selon 2 modes d'administration classiquement utilisés chez la souris : l'inoculation intracérébrale et l'injection intra-péritonéale, qui reproduisent les deux voies de contamination observées chez l'homme.

- La seconde procédure prévoit de laisser évoluer naturellement 2 lots de 50 poissons (1 lot de poissons transgéniques et 1 lot de poissons contrôles) afin d'observer le développement éventuel d'une pathologie spontanée (par similitude avec ce qui est observé chez la souris transgénique)

Le total de poissons pour les deux procédures et leur mise au point se monte au maximum à 600.

Les poissons seront ensuite observés (2 à 3 fois par jour) jusqu'au développement de signes cliniques (présence de blessures, altération de l'état général, comportement, ou nage anormale), puis euthanasiés afin d'évaluer l'accumulation des prions dans les différents organes cibles.

L'expérimentation chez l'animal est rendue nécessaire car c'est le seul moyen actuellement d'évaluer la sensibilité de ces animaux aux prions mammifères (les tests in vitro sont pour le moment non concluants). Le nombre important d'animaux requis est justifié par la longueur de l'expérimentation et prend en compte un taux de mortalité naturelle non négligeable. Des éléments d'enrichissement sont raisonnés pour éviter tout problème sanitaire et réduits à des objets calibrés testés, en particulier pour la mise en reproduction (billes de verre au fond des bacs de pontes). Les poissons interagissant beaucoup entre eux, ils constituent aussi, les uns pour les autres, un élément très fort d'enrichissement mutuel du milieu.

12189 Les effets des perturbateurs endocriniens sont observés depuis des décennies. Les perturbateurs endocriniens sont définis par l'OMS comme des substances ou des mélanges exogènes possédant des propriétés dont l'on peut attendre qu'elles conduisent à une perturbation endocrinienne sur un organisme intact ou sa descendance. L'agence européenne des produits chimiques (ECHA) et l'Autorité européenne pour la sécurité des aliments (EFSA) ont publié un guide définissant les moyens d'évaluer le caractère perturbateurs endocrinien des substance ou mélanges « Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009 »

Dans ce contexte l'essai de développement sexuel des poissons (EDSP) suivant la ligne directrice OCDE 234 ou une méthode équivalente peut être utilisé. L'EDSP évalue les effets aux premiers stades de la vie et les effets néfastes possibles de perturbateurs endocriniens potentiels (œstrogènes, androgènes et inhibiteurs de la stéroïdogénèse, par exemple) sur le développement sexuel. Dans cet essai, les poissons sont exposés, de l'œuf nouvellement fécondé à l'achèvement de la différenciation sexuelle.

Dans le cadre de cet essai, un test complet nécessite au maximum 840 poissons.

Le nombre maximum de poissons sur 5 ans sera de 8400 poissons.

Le guide définit une approche par niveau des tests à réaliser. Ainsi, dans un premier temps, la substance ou le mélange est évalué(e) à l'aide de méthode in vitro. L'essai OCDE 234 est réalisé dans le cadre de demande des autorités pour la confirmation ou non du caractère perturbateur endocrinien.

Dans un but de réduction du nombre d'animaux utilisés, la ligne directrice préconise l'utilisation au minimum de 3 concentrations de la substance d'essai et non d'une gamme de 5 concentrations. Ainsi, sauf demande des autorités, seules 3 concentrations seront utilisées. Dans un contexte de raffinement, les poissons seront maintenus dans un environnement permettant une croissance optimale en termes de qualité d'eau et d'alimentation. Dans le même contexte, Les points limites peuvent varier au cours du test selon le stade de développement :

*pour les œufs : en particulier au début de leur cycle, diminution marquée de la transparence et/ou modification de la coloration, provoquées par la coagulation et/ou la précipitation des protéines et conduisant à un aspect blanc opaque.

*pour les larves et les juvéniles : immobilité et/ou absence de mouvement respiratoire et/ou absence de battement du cœur et/ou coloration blanche opaque du système nerveux central et/ou absence de réaction à un stimulus mécanique.

12190 L'objectif de nos recherches est de comprendre les mécanismes moléculaires qui régulent l'augmentation massive (> 10,000) de la surface de la membrane plasmique des neurones au cours du développement du cerveau. L'objectif spécifique de ce projet est de tester l'hypothèse que ce processus implique des molécules qui régulent le trafic membranaire ou l'autophagie (un phénomène désignant notamment la dégradation normale des organites cellulaires). Cette hypothèse est étayée par des résultats préliminaires obtenus dans des neurones en culture. Cependant, il est nécessaire de confirmer ces résultats in vivo chez l'animal, car dans le cerveau, et plus particulièrement au cours du développement, les neurones sont exposés à tout un ensemble de signaux et d'interaction avec d'autres cellules, qu'on ne sait pas modéliser in vitro.

Pour tester cette hypothèse, nous modulerons l'activité autophagique par des approches pharmacologiques ou par un régime hypocalorique, et manipulerons le niveau d'expression de protéines candidates, connues pour leur implication dans le trafic membranaire, dans les neurones des embryons de rats en développement in utero par la technique d'électroporation in utero (IUEP) de femelles gestantes. L'électroporation permet l'injection rapide et ciblée de matériel génétique dans des cellules en utilisant des impulsions électriques pour créer des pores temporaires dans les membranes cellulaires. Nous examinerons les effets de ces manipulations sur le développement du cerveau (E11-Postnatal P28) à l'échelle macroscopique par imagerie à ultrasons sur les rats vivants, ou à l'échelle microscopique par des analyses immunohistochimiques sur les cerveaux prélevés après mise à mort des animaux. Ces effets seront évalués dans le contexte d'un régime normal ou hypocalorique pour simuler les conditions où les neurones ont un apport énergétique moindre par rapport aux conditions normales d'apport nutritionnel au cours du développement.

Pour respecter le principe des 3R, des expériences préalables réalisées dans des cellules en culture nous ont permis d'identifier les protéines et molécules candidates, les doses et les temps d'analyse les plus pertinents et ainsi éviter les expériences exploratoires chez l'animal. Afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés, nous avons préféré l'IUEP et les approches pharmacologiques à la transgénèse pour moduler l'expression des protéines d'intérêt et nous avons opté pour l'imagerie à ultrasons qui permet d'imager, chez le même animal, le cerveau à différents temps. Toutes les procédures seront réalisées par des expérimentateurs chevronnés, en utilisant les anesthésiques et analgésiques requis. Si la souffrance de l'animal ne peut être soulagée alors celui-ci sera mis à mort. Ce projet se déroulera sur une période de 5 ans et impliquera au total 1111 animaux : 101 rates et 1010 embryons et jeunes rats étudiés jusqu'à P28.

La réalisation de ce projet permettra de mieux comprendre ce processus fondamental d'élongation des membranes cellulaires dont les perturbations pourraient être à l'origine de maladies neurologiques ou psychiatriques.

12191 Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus* - SA) est l'espèce de staphylocoque la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire. Il est responsable d'un large éventail d'infections cliniques telles que des pneumopathies, des endocardites, des infections ostéoarticulaires, ainsi que des infections de la peau et des tissus mous (IPTMs). Son importance a explosé au cours des 20 dernières années avec l'émergence d'une épidémie mondiale d'IPTMs issues de souches communautaires de SA résistantes à la méticilline (CA-MRSA). Également, ces souches sont fréquemment résistantes à d'autres lignes antibiotiques et produisent de nombreuses toxines. Le développement de nouvelles alternatives dans le traitement des infections cutanées à SA est donc nécessaire. Enfin, la mise au point de modèles d'infection précliniques adaptés est également requise pour l'évaluation ultérieure de ces nouvelles thérapies.

Ce projet vise donc à développer un modèle stable d'infection cutanée à SA chez le lapin afin d'apporter un support robuste permettant l'évaluation de l'efficacité de nouvelles thérapies anti-SA.

Le stade très préliminaire de ce projet implique l'utilisation d'un faible nombre d'animaux. L'effort de réduction repose sur une stratégie d'expérimentation progressive nécessitant seulement 2 lapins par expérience dont les résultats permettront l'amélioration du mode opératoire de l'expérience suivante. Les principaux paramètres pouvant varier sont la charge bactérienne ainsi que le site d'inoculation des bactéries. Le nombre maximum d'animaux pour cette étude est estimé à 12.

Le développement d'une infection cutanée engendre une cascade de réactions physiologiques impliquant différents organes immunitaires ce qui rend le remplacement du modèle animal difficile. Également, les cellules immunitaires du lapin sont davantage semblables à celles de l'homme que ne le sont celles de la souris dans les infections à SA.

Dans un objectif de raffinement, les conditions d'hébergement sont optimisées par l'enrichissement du milieu. Un suivi biquotidien est également mis en place afin d'évaluer et de réduire au mieux la douleur de l'animal grâce à l'utilisation d'analgésique.

Dans le cas où un lapin montrerait des signes de douleurs non résolus par l'analgésie, il serait mis à mort.

12192 Nous nous intéressons aux dystrophies musculaires, un groupe hétérogène de maladies génétiques touchant le muscle squelettique. Elles sont caractérisées par une faiblesse musculaire et une dégénérescence progressive des muscles du corps. L'âge d'apparition des symptômes, le nombre de muscles touchés et la gravité de la maladie, peut varier selon la dystrophie musculaire. À l'heure actuelle, il n'existe pas un traitement curatif pour les dystrophies musculaires.

Des approches de thérapie génique ont été proposées pour améliorer le phénotype de certaines dystrophies musculaires, comme par exemple la dystrophie musculaire de Duchenne. L'utilisation de vecteurs viraux semble aussi une piste thérapeutique prometteuse. Bien que les vecteurs viraux de type AAV (virus adeno-associés, AAV) soient largement utilisés en littérature, des données concernant leur efficacité de transduction après injection intramusculaire n'est pas connue.

Ce projet consiste à étudier l'efficacité de transduction de virus de type AAV après injection intramusculaire chez la souris. Pour cela, le muscle Tibialis Anterior (TA) est injecté avec différents sérotypes d'AAV. Deux modèles de souris seront utilisés. Des souris contrôle pour investiguer l'efficacité de transduction dans un muscle sain et des souris dystrophique pour pouvoir comparer l'efficacité dans un muscle atteint de dystrophie musculaire et présentant une importante fibrose musculaire. Ce projet nous permettra de tester des différents sérotypes d'AAV pour la thérapie génique et établir le/les plus efficace(s) pour le traitement de différentes dystrophies musculaires.

Au total, 80 souris seront utilisées, 40 souris contrôle et 40 souris dystrophiques. Pour la réduction, nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire pour avoir des différences statistiquement significatives entre les groupes de souris. Également, afin de réduire le nombre de souris utilisées dans le respect de la règle des 3R, pour chaque souris les deux TA gauche et droite seront injectés.

L'injection des vecteurs de thérapie génique dans l'animal vivant est le seul moyen disponible pour en tester l'efficacité in vivo. Les souris sont anesthésiées lors de l'injection. Suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de déceler des signes de douleur

12193 Les projets de recherche développés dans notre laboratoire ont pour objectif de comprendre le mode de fonctionnement des gènes régissant le développement des cellules, tissus et embryons à la fois en conditions physiologique et pathologique (malformations congénitales, cancer, diabète, etc...). Au sein de notre animalerie, près de 60 lignées de souris transgéniques sont hébergées. L'essentiel de ces lignées a été généré dans notre laboratoire et représente des modèles d'animaux uniques. Actuellement, ces animaux sont exclusivement stockés sous forme de colonies vivantes. Afin de comprendre comment le dysfonctionnement d'un gène conduit à des malformations ou à des maladies génétiques nous travaillons sur des lignées de souris génétiquement modifiées. Aussi leur préservation est essentielle pour la poursuite des projets de recherches ayant motivé leur création. De plus, d'autres animaleries sur le site souhaitent bénéficier de cette possibilité de congélation de lignées.

De plus, La génération de ces modèles uniques d'animaux transgéniques représente un nombre important de souris utilisées. Il est donc primordial de préserver ces lignées contre tout accident qui aboutirait à leur éradication. Mais au-delà de l'aspect sécuritaire, la cryopréservation de l'ensemble des lignées de souris transgéniques au sein de notre animalerie a essentiellement un but éthique : cet objectif étant de réduire l'utilisation des animaux. Seulement une quinzaine d'animaux seront utilisés pour la cryopreservation permanente d'une lignée transgénique. Cette réduction considérable d'animaux utilisés nous motive fortement pour établir une banque d'embryons congelés au sein de notre laboratoire. De plus, la cryopréservation remplacera le transport d'animaux vivants par l'expédition d'embryons congelés, ce qui évitera le stress du voyage et du changement de l'animalerie ainsi que tout accident de propagation de germes pathogènes.

Cette demande d'autorisation prévoit :

- 1- la cryopréservation de l'ensemble de nos lignées sous forme d'embryons,
- 2- la revitalisation d'un échantillon test de chaque stock d'embryons congelés pour chaque lignée afin de valider la viabilité du stock,

Pour cela, nous projetons d'utiliser par lignée à congeler 12 femelles donneuses d'embryons à congeler, 1 à 2 femelles receveuses et 3 mâles vasectomisés. Au total, la cryopréservation des lignées transgéniques prévue sur 5 ans utilisera 1705 animaux, ce qui représente beaucoup moins que la conservation et l'entretien de ces lignées.

Les femelles seront super ovulées par injection intrapéritonéale afin d'obtenir un nombre maximum d'embryons par femelle et par conséquent optimiser leur utilisation. Les femelles receveuses subiront une intervention chirurgicale non dommageable qui consiste en la transplantation des embryons décongelés et leur développement jusqu'à terme. La douleur éventuellement engendrée par cette intervention simple est considérée comme faible et sera traitée de façon préventive par une injection d'anti-inflammatoire et par un traitement analgésique dans l'eau de boisson des animaux pendant plusieurs jours suivant l'intervention. Les mâles seront vasectomisés directement par le fournisseur, et soumis à une procédure du fait de leur hébergement « seul dans la cage ».

12194 L'hormone glucocorticoïde (GC) libérée en réponse au stress régule diverses fonctions biologiques importantes (comportement, système immunitaire, métabolisme..) via l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) - exprimé dans tous les types cellulaires.

Plusieurs études ont montré un taux significativement élevé de cortisol chez des patients souffrant de la maladie de Parkinson ou de la maladie d'Alzheimer ce qui suggère l'implication de GC et de son récepteur, le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) dans la pathogenèse de ces maladies neurodégénératives.

Notre projet de recherche vise à étudier les mécanismes par lesquels cette hormone et son récepteur GR, agissent dans le développement et la progression de la maladie de Parkinson et la

maladie d'Alzheimer. Ce projet concerne aussi l'étude du rôle des interactions GC-GR dans le stress environnemental qui est connu pour exacerber les processus neurodégénératifs. Dans nos lignées de souris, (invalidées pour le GR dans différents types cellulaires), nous effectuerons un stress chronique modéré imprévisible, connu pour perturber l'axe Hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS), la neurotransmission et le système immunitaire. Les tests comportementaux (par exemple le test de nage forcée, le rotarod et le labyrinthe en croix surélevé) seront effectués après le stress. L'effet du stress sera étudié dans un contexte pathologique, par exemple, la dégénérescence des neurones dopaminergiques induite par un inflammogène (facteur induisant la réaction inflammatoire) ou par la toxicité induite par l'alpha-synucléine ou par la protéine Tau mutée. Ce projet nécessite de travailler in vivo sur l'animal entier pour comprendre le rôle du GR dans des processus divers tels que le comportement, les modifications des cellules immunitaires, neuronales ou gliales. Nous utilisons les lignées de souris dans lesquels le GR est inactivé dans un type cellulaire qui permet d'appréhender les effets protecteurs ou néfastes du stress et du GR dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives Parkinson et Alzheimer. Dans ce contexte, nous étudierons aussi le rôle du Toll-Like récepteur 9 (TLR9- un récepteur immunitaire dont l'activation déclenche une réaction inflammatoire) par le biais de souris invalidées pour le TLR9 (TLR9KO) dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson car nos données récentes montrent que le TLR9 est étroitement régulé par le GR et est impliqué dans la neurodégénérescence.

Nous développerons dans ces lignées les modèles expérimentaux de ces maladies neurodégénératives. Nous utiliserons, pour la maladie de Parkinson, la neurotoxine 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) ou les formes pathologiques d'alpha-synucléine ou LRRK2 (Leucine Rich Repeat Kinase 2). Pour la maladie d'Alzheimer, nous utiliserons la forme pathologique de Tau pour induire la pathologie.

Au cours de ce projet, qui durera trois ans, nous effectuerons des études comportementales, neuropathologiques, neuroendocrines et moléculaires/cellulaires qui nécessiteront l'utilisation de 660 souris conditionnelles du GR ou LRRK2 et le TLR9KO de même fond génétique. Cela permettra d'obtenir une vision intégrée de l'effet du traitement ou de l'invalidation et en même temps de réduire le nombre d'animaux utilisés. Nos travaux seront réalisés dans l'application de la règle des 3R : réduire, raffiner, remplacer. Afin de réduire le nombre d'animaux, une planification rigoureuse combinée à une étude statistique sera effectuée pour calculer le nombre adéquate d'animaux par génotype ou par traitement dans le but d'obtenir des résultats fiables et exploitables ; Pour le raffinement : dans le respect du bien-être de l'animal, un soin particulier sera apporté selon le degré de sévérité de la procédure expérimentale (chirurgie ou comportement éprouvant pour l'animal) aux animaux pour la réduction du stress et de la douleur en combinant des anesthésiques et antalgiques locaux et généraux (chirurgie) et en faisant l'objet d'un suivi rigoureux pendant la procédure ainsi que les jours suivants la procédure par l'expérimentateur compétent afin d'évaluer et d'éviter toute souffrance de l'animal (chirurgie et comportement). Remplacement : La nature expérimentale de notre recherche requiert l'utilisation de modèles animaux. Néanmoins, nous utiliserons aussi, pour les études moléculaires, des cultures cellulaires pour limiter le nombre d'animaux utilisés.

12195 Le Myélome Multiple (MM) et la leucémie lymphoïde chronique (LLC) sont deux maladies malignes caractérisées par la prolifération incontrôlée d'un type particulier de cellules sanguines de la famille des globules blancs. Dans le cas du MM, il y a une prolifération des plasmocytes (cellules productrices des anticorps) et dans le cas de la LLC ce sont des lymphocytes B tumoraux qui s'accumulent dans la moelle osseuse, la rate et les ganglions. Les traitements actuels du MM et de la LLC reposent sur la chimiothérapie et la greffe de moelle osseuse. Bien que ces traitements aient amélioré la survie des malades, certains patients répondent mal aux traitements conventionnels. Une nouvelle stratégie thérapeutique, ayant déjà fait ses preuves dans le traitement d'autres cancers du sang, vise à forcer les défenses immunitaires à reconnaître et à détruire les cellules cancéreuses.

Dans le contexte du MM et de la LLC, nous avons choisi de modifier génétiquement une population de cellules du système immunitaire (les lymphocytes T) afin qu'ils reconnaissent spécifiquement les

cellules tumorales et les éliminent, le but ultime étant d'améliorer la prise en charge des patients résistants aux traitements classiques.

Pour mener à bien ce projet, nous mettrons dans un premier temps en place un modèle de souris développant un MM ou une LLC (injection par voie intraveineuse ou sous-cutanée de cellules tumorales de MM humain à des souris éveillées dépourvues de système immunitaire, évitant ainsi le rejet de greffe). Le développement de la tumeur et l'efficacité thérapeutiques de nos cellules modifiées (administrées une seule fois par voie intraveineuse) seront suivis par imagerie in vivo sur souris anesthésiées et sera réalisée une fois par semaine pendant toute la durée de l'étude (soit 12 acquisitions au maximum).

Parallèlement à cet axe de recherche, nous souhaitons évaluer la contribution de biomolécules dans le développement du MM. Celles-ci, dont le rôle est encore mal défini, pourraient jouer un rôle dans le développement de certains cancers et pourraient constituer une nouvelle cible thérapeutique. En pratique, nous injecterons par voie intraveineuse à des souris éveillées dépourvues de système immunitaire (afin d'éviter le rejet de greffe), des cellules tumorales humaines de MM dans lesquelles les longs fragments d'acide nucléique seront exprimés ou non. Le suivi du développement de la maladie se fera par des prélèvements réguliers (toutes les 2 semaines) d'une très petite quantité de moelle osseuse (ponction réalisée sur souris anesthésiée).

En accord avec la règle des 3R, nous avons réalisé le maximum d'expériences in vitro afin de valider l'efficacité de nos molécules thérapeutiques. Néanmoins, il est nécessaire de vérifier ces résultats dans un modèle in vivo intégrant la plupart des caractéristiques de ces pathologies humaines telles que l'hétérogénéité des cellules tumorales, l'existence de tissus sains, la présence de barrières limitant l'efficacité des traitements. Nous avons réduit le nombre de souris utilisés au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 1020 souris, sur une durée de 5 ans.

Une attention toute particulière sera également portée au bien-être des animaux par une surveillance journalière assurée par le personnel de l'animalerie et les expérimentateurs. Nous veillerons, par ailleurs, à réduire au minimum l'intensité et la durée des souffrances ressenties par les animaux, en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence physique, le poids et le comportement des animaux. Les souris présentant des souffrances, des douleurs et/ou des angoisses (atteinte du point limite) seront euthanasiés selon la méthode réglementaire. Le suivi des souris en expérimentation se fera sur une période maximale de 3 mois, à l'issue de laquelle tous les animaux seront euthanasiés.

12196 L'hème oxygénase (HO-1) est une protéine inductible par le stress, qui dégrade l'hème et libère le monoxyde de carbone (CO). Le CO est un médiateur intracellulaire bien connu, il a un rôle important d'antioxydant endogène ainsi que plusieurs activités pharmacologiques : vasodilatatrice, anti-ischémique et anti-inflammatoire. Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de la voie de l'HO-1 dans l'induction et l'augmentation de la production du CO. Cette surproduction de CO est bénéfique pour la fonction cellulaire dans des conditions pathologiques. De ce fait, il paraît fort intéressant d'exploiter cette voie pour des applications thérapeutiques.

Dans ce contexte, notre laboratoire a développé une nouvelle génération de molécules chimiques de synthèse de monoxyde de carbone (« Carbon monoxide-Releasing Molecules » ou CO-RMs). Ces molécules permettent un apport contrôlé de CO exogène et présentent une action protectrice des cellules.

Les résultats encourageants de nos études concernant l'effet protecteur de ces CO-RMs dans diverses maladies comme l'infarctus du myocarde, l'inflammation et les dysfonctions vasculaires et métaboliques convergent vers la mise en évidence de l'importance du rôle du CO comme moyen thérapeutique. Plus récemment nous avons montré que l'administration orale de CO-RM, qui libère du CO avec une efficacité élevée, à des souris recevant un régime riche en graisses, a entraîné une réduction significative du gain de poids corporel et était associée à une amélioration marquée de la glycémie et de la résistance à l'insuline. Ainsi notre hypothèse est que le CO endogène pourrait jouer un rôle bénéfique important dans la régulation de la dépense énergétique. L'objectif principal

de notre projet sera donc d'étudier le rôle de la voie NRF2/HO-1/CO dans le contrôle du métabolisme et de la dépense énergétique au cours de périodes du jeûne intermittent et/ou de suralimentation.

Le présent projet consiste à utiliser des souris C57BL6 (non génétiquement modifiées) et des souris invalidées pour le gène Nrf2 qui seront soumises à un jeûne intermittent avec une alimentation standard ou riche en graisses, avec ou sans l'administration de CO-RMs. Dans le contexte des 3R, l'analyse bibliographique nous a conduits à réduire les effectifs à 10 souris par groupe et nous réutiliserons les mêmes animaux pour reproduire les premiers résultats. D'autre part nous ne disposons pas actuellement de modèles in vitro de diète riche en gras et de jeûne intermittent ; cependant pour éviter l'utilisation d'un autre type murin, nous construirons de cellules modifiées pour le gène HO-1 par la technique CRISPR/Cas9. Enfin pour le raffinement, les animaux seront anesthésiés, prélevés et mis à mort selon la réglementation en vigueur. Concernant le prélèvement sanguin sans anesthésie, nous recueillerons un très faible volume et l'adéquation volume/méthode permet de respecter le bien-être animal. Au cours des 5 prochaines années, nous prévoyons d'utiliser 800 souris pour développer 3 procédures.

12197 Notre aptitude à communiquer par la voix ou à apprécier la musique repose sur l'analyse du contenu fréquentiel de ces sons complexes sur une large gamme de fréquences. Pour ce faire, l'organe sensoriel auditif de l'oreille renferme des cellules « microphones » ciliées qui sont chacune spécialisées dans la détection d'une composante fréquentielle du stimulus sonore. Ces cellules assurent la transmission d'une onde de pression sonore (ouïe) en un signal électrique qui se propage ensuite le long de voies nerveuses jusqu'au cerveau. Bien qu'immergées dans un liquide visqueux qui devrait amortir toute vibration mécanique, certaines structures de l'oreille interne semblent capables de rentrer en résonance avec le stimulus sonore. Pour vibrer si efficacement, les cellules ciliées doivent fournir un travail mécanique afin d'amplifier la sensibilité et d'affiner la sélectivité fréquentielle de la détection auditive. Cette amplification présente un double avantage pour la détection auditive : elle permet i) d'élargir la gamme d'intensités sonores détectées en n'amplifiant que les stimuli de faible intensité et ii) d'affiner la sélectivité en terme de fréquence de la détection.

Une meilleure compréhension des mécanismes de réglage de la morphologie de l'ensemble des stéréocils de la cellule ciliée selon la sélectivité fréquentielle de la sensibilité auditive, ainsi que des mécanismes de leur détérioration chez les animaux sourds, devrait permettre d'établir des bases fondamentales pour développer de nouvelles approches thérapeutiques de la surdité.

Dans ce projet, nous proposons d'étudier ces cellules ciliées et plus particulièrement les stéréocils qui fonctionnent comme une antenne mécanosensible. Les stéréocils fournissent un exemple remarquable de couplage morphologie (longueur, nombre des cils)-fonction, semblant donc opérer comme un diapason (vivant) dont la taille contrôle la fréquence caractéristique de vibration. Ce projet a ainsi pour objectif d'éclairer notamment le mécanisme qui détermine la taille des stéréocils en relation avec la fréquence caractéristique de la cellule ciliée correspondante. Ces études de mécanophysique ne se font pas sur animal vivant mais in vitro sur cellules fraîchement prélevées chez la Grenouille. L'oreille interne de la Grenouille est un modèle particulièrement bien décrit, reproduisant celle des Mammifères. Les cellules ciliées sont très fragiles et ne peuvent être conservées que quelques heures, aucune méthode alternative n'est disponible. Les grenouilles ne subiront aucun geste invasif mais seront mises à mort pour prélèvement post-mortem des cellules d'intérêt, permettant ainsi d'éviter toute souffrance chez l'animal.

En raison de la fragilité des cellules et du grand nombre de cellules nécessaires pour les différentes analyses de stimulation mécanique, nous envisageons d'utiliser 830 Grenouilles domestiques (même espèce que celle élevée pour la gastronomie).

12198 Plus de 100 000 transplantations sont effectuées chaque année dans le monde, la transplantation constituant le seul traitement possible en cas de défaillance d'un organe vital, sans alternative thérapeutique. La principale difficulté en transplantation d'organes est de faire accepter le greffon au système immunitaire du receveur. L'induction d'une tolérance à l'organe transplanté représente

donc un objectif majeur de la recherche en transplantation car elle permettrait d'empêcher le rejet de l'organe.

Nous nous proposons d'induire une tolérance à la greffe d'organes en utilisant le thymus du donneur. Le thymus est un organe qui joue un rôle essentiel dans la reconnaissance du « soi » et du « non-soi ». Il éduque les lymphocytes T pour qu'ils soient capables de reconnaître les agents pathogènes étrangers et il élimine les lymphocytes T ayant une capacité de reconnaissance du soi trop importante, évitant ainsi la survenue de maladies auto-immunes.

Pour induire cette tolérance à l'organe greffé, nous proposons d'enlever le thymus du receveur et de greffer le thymus du donneur en même temps que l'organe transplanté, afin d'éduquer les lymphocytes T du receveur au contact des cellules du receveur et du donneur.

Le but de ce projet est : i) Evaluer si la greffe de thymus, dans un modèle expérimental utilisant des rats génétiquement différents, permet de restaurer la fonction thymique chez un animal dont le thymus a été préalablement enlevé. La procédure consistera en une thymectomie (durée 30minutes) chez des receveurs Lewis âgés de quatre semaines, puis deux semaines plus tard à une greffe thymique (durée : 20 minutes) à partir de 4 groupes de donneurs de 4 semaines: un groupe de rats Brown Norway traité par immunosuppresseurs, deux groupes mixtes Lewis et Brown Norway dont l'un est immunodéplété et un groupe de Lewis contrôle. ii) Utiliser dans un second temps ce modèle de greffe thymique pour induire une tolérance à un greffon aortique: pour cela, après avoir enlevé le thymus de receveurs Lewis, on réalisera deux semaines plus tard, une transplantation thymique et aortique (durée 40minutes) à partir de greffons thymique et aortique des donneurs ayant le mieux répondu à la greffe thymique en i) pour le groupe 1. Le deuxième groupe de receveurs recevra un greffon thymique Lewis avec un greffon aortique de donneurs ayant le mieux répondu en i)

Des mesures visant à améliorer le bien-être (enrichissement) et à réduire la contrainte et la douleur (analgésie) seront prises avant, pendant et après les chirurgies, elles-mêmes réalisées sous anesthésie. Les animaux seront suivis quotidiennement et les signes indiquant une souffrance seront particulièrement suivis et traité selon un scoring antidouleur. Si les signes de la douleur persistent malgré un traitement antidouleur optimal, cela constituerait un point limite et les animaux seront euthanasiés. Les donneurs seront euthanasiés à la fin de l'opération et les receveurs euthanasiés deux mois post-transplantation. Il n'existe pas de techniques de substitution, seule l'expérimentation animale permet de répondre à la question soulevée par le projet. Les effectifs dans chaque groupe ont été réduit au maximum. Le projet a pour objectif de démarrer dès l'autorisation et de s'étendre sur un an.

Soixante animaux (35 rats Lewis 5 rats Brown Norway et 10 LEW/BN + 10 rats du groupe ayant le mieux rétabli la fonction thymique) seront nécessaires pour conduire ce projet.

La mise au point des modèles animaux nécessitera 30 rats supplémentaires, qui seront euthanasiés en fin de procédure.

12199 Au cours d'une inflammation, des monocytes sont rapidement recrutés et se différencient dans les tissus en macrophages ou cellules dendritiques, qui ont des rôles différents dans les réponses immunitaires normales. De plus, dans les maladies inflammatoires, ces cellules dérivées des monocytes ont un rôle néfaste en perpétuant l'inflammation dans les maladies telles que psoriasis, maladie de Crohn ou arthrite rhumatoïde.

Les mécanismes de différenciation des monocytes restent mal caractérisés. En particulier, on ne connaît pas l'impact des microbes sur ce phénomène.

Dans une première étude in vitro, nous avons mis en évidence que les signaux de danger produits par les microbes influencent la différenciation des monocytes humains. Afin de déterminer la pertinence physiologique de nos observations, et donc leur application clinique potentielle, il est désormais nécessaire d'utiliser un modèle in vivo chez la souris. Les souris seront exposées à des composants microbiens afin d'analyser la différenciation des monocytes dans un contexte physiologique complexe.

Cette étude durera au maximum 5 ans. Nous utiliserons des souris C57BL/6 qui sont un modèle classique et largement accepté par la communauté scientifique internationale.

Ce projet répond aux exigences de remplacement, réduction et raffinement. Un maximum de 1728 animaux sera utilisé pour ce projet. Pour chaque expérience, nous utiliserons le minimum d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables et scientifiquement valides (incluant les groupes contrôles nécessaires). De plus, chaque animal sera utilisé pour analyser plusieurs paramètres des cellules du système immunitaire, ce qui permettra d'optimiser les données obtenues sur chaque animal. Aucun prélèvement ne sera réalisé sur les souris vivantes. Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

12200 La préservation de la fécondité suscite une inquiétude croissante. Depuis les dernières décennies, la fertilité a diminué dans les pays industrialisés et aujourd'hui, l'infertilité atteint une prévalence de 9 à 18% de la population générale. En conséquence, un nombre croissant de couples a recours à la procréation médicalement assistée, sans grand succès par manque de connaissances sur les cellules reproductrices, appelées également cellules germinales. L'étude de ces cellules constitue un socle essentiel pour des applications médicales, mais jusqu'à présent, les mécanismes moléculaires qui régissent leur production restent peu compris en raison de l'absence de modèles d'étude physiologiques.

Les cellules germinales sont produites au cours du développement embryonnaire par la gonade (ovaire ou testicule), où les cellules germinales primordiales se multiplient pour constituer un stock suffisant, se différencient en fonction du sexe de l'embryon, puis entrent en méiose pour devenir des cellules fertiles, les ovocytes (femelles) et les spermatozoïdes (mâles).

Des expériences pharmacologiques sur des cultures de gonades *in vitro* ont conduit à l'identification d'une molécule, l'acide rétinoïque (AR), décrite comme le facteur indispensable à l'entrée en méiose des cellules germinales. Cependant, ces données ont été remises en question par une étude *in vivo* mettant en évidence les artefacts liés aux modèles *in vitro*. A ce jour, le rôle physiologique de l'AR dans les cellules germinales reste controversé.

Par ailleurs, des analogues de l'AR, conçus pour traiter des maladies de la peau (acné), sont disponibles sur le marché. Les enfants traités avec ces rétinoïdes entre 1980 et 1990 ont atteint aujourd'hui l'âge de procréer, mais aucune étude n'a évalué les effets de ces traitements sur leur fertilité. Cette situation est préoccupante car un excès d'AR chez les rongeurs mâles crée des lésions testiculaires et perturbe la spermatogenèse. Quant au rôle de l'AR sur l'ovaire *in vivo*, il n'est pas connu à ce jour.

Lors d'un précédent PEA, pour déterminer si l'AR joue un rôle dans l'ovaire embryonnaire *in vivo*, nous avons utilisé un modèle murin ne produisant pas d'AR. Nos résultats suggèrent que l'AR n'est pas nécessaire à la méiose, mais qu'il joue un rôle bien plus précoce dans les cellules germinales primordiales. Nous souhaitons poursuivre cette étude en décortiquant le mode d'action de l'AR à la fois dans les cellules germinales primordiales et dans les autres types cellulaires de l'ovaire avec 3 modèles de souris mutantes: 1) souris ne produisant pas d'AR, 2) souris ne pouvant pas répondre à l'AR, et 3) souris permettant de suivre le devenir des cellules ayant répondu à l'AR. En comparant une situation physiologique normale (présence d'AR) avec une situation où la signalisation de l'AR est bloquée, ces expériences permettront d'établir une description fine de la fonction biologique de l'AR, des types cellulaires impliqués et des stades du développement concernés.

L'ensemble de ce projet utilise une procédure simple d'administration de tamoxifène afin "d'éteindre" ou "d'allumer" l'expression des gènes d'intérêt en ciblant un type de cellules donné à un moment choisi du développement, ce qui n'affectera que très faiblement la qualité de vie des animaux. En effet, les animaux utilisés pour générer les embryons ne présentent pas de phénotype dommageable, leur élevage est maintenu en routine dans notre animalerie, et les embryons dans lesquels la mutation sera induite seront sacrifiés avant la naissance.

Ce projet a été élaboré et sera réalisé dans le respect de la règle des 3R:

1) le nombre minimal d'animaux nécessaires sera utilisé tout en conservant la pertinence des données statistiques, soit 710 souris (30 mâles reproducteurs, 200 femelles gestantes et 480 embryons de stade de développement postérieur au 2ème tiers de la gestation) ("réduire") ;

2) les animaux seront hébergés par deux ou trois dans des cages comportant des objets à ronger et des igloos pour se faire un nid de façon à garantir leur bien-être et leur permettre d'exercer les activités spécifiques à leur espèce. ("raffiner") ;

3) le recours à l'expérimentation animale est essentiel pour la biologie du développement et l'étiologie de l'infertilité ("remplacer"): en effet, les techniques de culture cellulaire ne permettent pas d'appréhender le développement gonadique qui nécessite vascularisation et contexte tridimensionnel et ont montré leurs limites en aboutissant à des résultats erronés.

Ce travail permettra de mieux comprendre la biologie des cellules germinales et de proposer aux patients infertiles des solutions thérapeutiques appropriées. Par ailleurs, l'utilisation de contraceptifs à base d'inhibiteurs de l'AR a été récemment proposée. Décortiquer le mode d'action de l'AR dans la gonade in vivo apportera des connaissances indispensables avant d'envisager ce type d'approche.

12201 Une quantité importante des traitements du cancer consiste en une chirurgie pour enlever la tumeur du corps du patient. Or, à l'heure actuelle, aucune méthode ne permet de visualiser la tumeur. La chirurgie est simplement basée sur les sens du chirurgien, dans ce cas l'examen visuel et la palpation des tissus. Par conséquent la chirurgie du cancer reste aujourd'hui subjective et dépendante de l'expérience du chirurgien.

L'imagerie de fluorescence, à travers l'utilisation d'un médicament qui cible les cellules tumorales et les rend « visible », nous offre un potentiel inégalé pour différencier les tissus sains à préserver, des tissus malsains à réséquer. Cette nouvelle modalité d'imagerie pourrait permettre de rendre la chirurgie objective, et par la même permettre de réduire la morbidité, la mortalité, les complications post-opératoires et le nombre de ré-opérations tout en réduisant les coûts de santé et en harmonisant la qualité des soins sur le territoire.

Malheureusement, les techniques actuelles ne permettent pas de connaître avec précision la quantité de cellules tumorales car elles sont influencées par les propriétés des tissus autour de la tumeur (sang, graisse, mélanine). Nous avons développé une nouvelle approche qui est quantitative et permettant de connaître avec une grande précision la quantité de fluorescence et donc de cellules tumorales quelle que soient les propriétés des tissus environnants. Dans ce projet, nous souhaitons tester cette méthode sur modèle animal, la souris. Pour valider si cette méthode permet de mesurer la fluorescence objectivement dans des conditions in vivo sans être influencé par les propriétés des tissus vivants, différents modèles tumoraux murins mimant la pathologie humaine seront utilisés. Les dommages escomptés sont l'apparition de pathologies cancéreuses chez l'animal, dont la souffrance chez celui-ci sera évaluée et traitée. Ce travail bénéficiera à l'homme et servira de base pour effectuer la translation de cette nouvelle méthode à la chirurgie du cancer sur l'homme.

Réduire:

Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisamment pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente. L'utilisation de différents systèmes d'imagerie sur un même animal permet de réduire le nombre d'animaux par la mise en place d'un suivi longitudinal. Une étude exhaustive des données récentes de la littérature n'a pas permis d'identifier une équipe réalisant des expériences similaires.

Raffiner:

Les souris sont maintenues en groupe de 5 par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels et de balancelle en plastique rouge pour favoriser l'activité des souris. Les souris ont accès ad libitum à une nourriture de type normal et à de l'eau filtrée. Le protocole expérimental prend en compte l'impact sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour détecter

toute souffrance animale. En cas de souffrance, un traitement analgésique adapté sera mis en place jusqu'à disparition des symptômes.

Remplacement:

Il n'existe pas de méthodes alternatives pour remplacer le présent projet, dont le but est de réaliser une quantification des signaux de fluorescence dans le spectre proche infrarouge au niveau de différents types tumoraux et dans différentes localisations. Ce sont des processus complexes qui ne peuvent être appréhendés que chez l'animal, dans notre cas chez la souris. Ce modèle récapitule bien les différentes étapes de la progression tumorale humaine et permet de plus l'utilisation de cellules humaines via la souris immunodéficiente Foxn1 nu/nu.

100 souris seront utilisées dans ce projet.

12202 La cryoconservation des embryons est une des biotechnologies de la reproduction qui permet de différer dans le temps et dans l'espace le transfert des embryons sur des femelles receveuses, donc de le réaliser uniquement lorsqu'une receveuse est disponible, ce qui réduit considérablement le coût d'entretien des animaux. D'autre part, elle permet de maintenir la diversité génétique des races et de sauvegarder celles qui seraient en voie d'extinction dans la Cryobanque Nationale.

Dans l'espèce équine, une technique a été validée sur l'embryon : elle donne des résultats satisfaisants (50 à 60% de gestation), mais elle n'est pas applicable sur le terrain. Elle nécessite l'infrastructure d'un laboratoire de recherche. Une technique plus simple doit être mise en place et être validée par des transferts d'embryons par voie naturelle sur femelles receveuses. Pour ce faire, il faut disposer d'embryons produits *in vivo*.

Chez les ânes, la technique de cryoconservation qui a fait ses preuves sur l'embryon équin et qui est réalisée en laboratoire de recherche doit être dans un premier temps testée. Elle devra être ensuite validée *in vitro* et *in vivo* avec des transferts d'embryons sur des ânesses. Pour ce faire, comme pour l'espèce équine, il faut disposer d'embryons produits *in vivo*.

L'objectif de ce projet est donc d'obtenir des embryons *in vivo* pour la mise au point d'une méthode simplifiée de cryoconservation dans l'espèce équine et chez les ânes. Pour réaliser ce projet, nous allons utiliser 119 animaux répartis de la manière suivante:

- pour les ânes: 20 femelles et 2 mâles
- pour les poneys: 94 femelles et 3 mâles

Afin de REDUIRE le nombre d'animaux à utiliser, nous avons choisi d'induire l'ovulation des femelles. C'est une technique couramment utilisée sur le terrain et qui donne de bons résultats dans l'espèce équine. Nous pouvons, après induction de l'ovulation, obtenir des embryons à la collecte dans plus de 70% et 40% des cas, chez les ponettes et chez les ânesses respectivement, contre seulement 45% et moins de 20%, sans induction, pour les deux mêmes espèces respectivement.

La procédure d'induction choisie est RAFFINEE : elle minimise au maximum les interventions même peu douloureuses pour l'animal. En effet, l'induction de l'ovulation des femelles, donneuses comme receveuses, se fait grâce à une unique injection sous cutanée de 0,5 mg d'acétate de buséréline, lorsque le diamètre du follicule atteint 33mm. Lors de la collecte et du transfert proprement dit, qui sont faits par les voies naturelles par un expérimentateur qualifié et habilité, les femelles seront mises sous légère sédation (Sedivet 1 ml à 10 mg/ ml). L'environnement dans lequel les étalons et les femelles de l'étude se trouveront sera celui d'un bâtiment conventionnel sur aire paillée avec accès au pâturage, en visibilité et contact des congénères pour rendre le plus agréable possible leur séjour durant les expérimentations.

REMPLETER l'utilisation des ponettes et des ânesses dans cette expérimentation n'est pas possible, puisque c'est pour ces espèces que nous souhaitons améliorer la cryoconservation des embryons. Il n'y a pas de modèle équivalent. D'autre part, la production d'embryons *in vitro* n'est pas opérationnelle dans ces deux espèces. Nous avons besoin au maximum de 54 cycles oestriens de ponettes donneuses, 40 cycles de ponettes receveuses et de 23 cycles d'ânesses pour la réalisation annuelle de ce projet.

12203 Les études épidémiologiques montrent que l'exposition à des pesticides favorise chez l'homme la maladie de Parkinson, ainsi que les déficits cognitifs, une composante essentielle de la maladie d'Alzheimer. La présence de plaques amyloïdes, l'une des lésions essentielles de la maladie d'Alzheimer constituée de protéine b-amyloïde, est très fréquente chez l'homme et peut précéder de plusieurs décennies les troubles de mémoire caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, dont la survenue ou l'aggravation pourraient être accélérées par l'exposition à des facteurs toxiques environnementaux. Malgré la présence de ces plaques certains sujets ne développeront pas de troubles de mémoire pendant de nombreuses années. Parallèlement, des travaux récents par croisements des souris génétiquement modifiées modèles de la maladie de Parkinson et d'Alzheimer, montrent que la présence dans le cerveau de plaques amyloïdes, augmente l'agrégation de la protéine alpha-synucléine, une protéine clé dans la maladie de Parkinson et dans certaines démences. De façon inattendue cette agrégation de l'alpha-synucléine jouerait un rôle très important dans le développement des déficits de mémoire lors de la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, notre étude contribuera ainsi aux travaux expérimentaux, encore très rares, permettant d'évaluer dans quelle mesure l'exposition à des pesticides pourrait contribuer au développement de la maladie. Nos travaux portent sur l'effet de l'exposition à un pesticide, le paraquat, dans l'eau de boisson de souris génétiquement modifiées issues d'un croisement entre des souris modèles de la maladie de Parkinson (« Park») et des souris modèles de la maladie d'Alzheimer (« Alz »). Les souris (450 au total) seront exposées, ou non, au paraquat dans l'eau de boisson, de façon chronique et à faible dose, à partir de l'âge de 2 mois, et seront euthanasiées 1.5, 3 ou 6 mois après le début de l'exposition. Aucun signe clinique n'est a priori attendu chez ces souris pendant ce suivi. Après la mort des animaux, les cerveaux et les moelles épinières, ainsi que les intestins, seront prélevés pour des études biochimiques et histologiques, portant sur l'agrégation des deux protéines essentielles (alpha-synucléine et bêta-amyloïde, impliquées dans les maladies de Parkinson et d'Alzheimer respectivement) et sur les mécanismes qui peuvent l'accompagner dans le tissu nerveux (stress oxydatif et inflammation). Dans l'hypothèse où le croisement des souris « Park » et « Alz » aggraverait de façon très importante la pathologie de l'un des deux modèles de souris choisis, nous prévoyons, par précaution, des points limites et procéderons à l'euthanasie des animaux. La procédure du projet ne génère pas de douleur, de souffrance ni de stress pour les animaux. Les nombres d'animaux sont limités au minimum nécessaire à la validation statistique des résultats. Les animaux sont élevés dans des cages à environnement enrichi (igloo, Neslets). Les résultats du projet pourraient permettre d'envisager à terme des méthodes alternatives ex vivo reproduisant les marqueurs moléculaires d'intérêt révélés par ces travaux. Cette étude ne peut être reproduite in vitro.

12204 Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires. Les traitements conventionnels de nombreux cancers tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ont démontré des limites d'efficacité nécessitant un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques.

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

La perspective de ce projet est d'évaluer et de comparer, dans différents modèles de xénogreffes humaines de cancers, différents virus oncolytiques exprimant des gènes thérapeutiques (virus « armés »). Dans ce projet, les armements testés seront des gènes humains codant pour des molécules qui activent le système immunitaire afin de potentialiser l'activité antitumorale.

Le projet se propose donc de mesurer l'effet bénéfique que pourrait apporter la combinaison de l'effet d'un virus oncolytique et de molécules connues pour stimuler de manière efficace le système immunitaire. Ces études seront réalisées dans des modèles murins « humanisés », par injection de cellules immunitaires humaines, afin d'évaluer l'efficacité anti-tumorale de virus « armés ». Cette activité thérapeutique sera analysée dans une large variété de modèles humains de cancers. Les

cancers ciblés correspondent aux tumeurs pour lesquelles il y a un fort besoin médical en clinique humaine.

Les résultats issus de ce projet permettront une meilleure compréhension des mécanismes d'activité des virus oncolytiques et de l'apport du système immunitaire.

Les résultats permettront également de valider chez l'animal l'activité thérapeutique anti-tumorale de nouvelles générations de virus oncolytiques dans différents types de cancer.

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

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

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

Un nombre maximal de 3200 souris (immunodéficientes) est envisagé pour ce projet.

- Raffiner : Tout au long de leur vie, une attention particulière est portée au bien-être des animaux en particulier par un enrichissement de leur milieu de vie qui leur permet d'assouvir les comportements liés à leur espèce, tel que du matériel de nidification. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux pendant toute la durée des expérimentations, dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères, avec eau et nourriture *ad libitum*. La réalisation par des techniciens rompus à ses manipulations garantissent la bonne reproductibilité des expériences et un suivi optimal du bien-être des animaux.

Les effets dus au traitement seront surveillés et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux et des tumeurs (grille de score évaluant le volume tumoral, l'apparence de la tumeur, l'évolution pondérale, l'apparence physique général, le comportement) sont mis en place afin de limiter le stress et la souffrance des animaux. Un score de 2 entraîne un mode de soulagement après avis du responsable de projet. Pour toute technique le nécessitant, une analgésie et / ou une anesthésie est prévue dans ce projet.

12205 Chaque année 1,5 millions d'européens sont victimes d'un traumatisme crânien le plus souvent subit lors d'un accident de la route, d'une chute ou au cours de pratiques sportives. 70 000 personnes perdent la vie des suites du traumatisme et environ 100 000 ne présentent pas de récupération totale et demeurent handicapés, notamment chez les enfants et les jeunes adultes qui représentent une population particulièrement vulnérable en regard de ce type de traumatisme. Bien qu'au cours des dernières années un raffinement des procédures de prise en charge par les urgences et les hôpitaux a permis de réduire la mortalité des traumatisés crâniens, il est apparu qu'un grand nombre de patients souffrent par la suite de désordres chroniques invalidants tels que : épilepsie, dépression, démence progressive, etc. À ce jour, aucun traitement ne permet d'empêcher la mise en place de tels désordres à la suite d'un traumatisme crânien.

Le projet que nous avons développé vise à étudier les changements qui se mettent en place à la suite d'un traumatisme crânien au sein du cerveau et qui contribuent aux atteintes comportementales à long terme. Dans le but d'obtenir une vision globale des dommages causés par un traumatisme crânien (TC), un consortium européen a été mis en place afin de tester différents modèles de TC, d'intensité légère à modérée, et de créer une banque d'échantillons et d'imagerie. La réalisation multicentrique de cette étude vise à pallier le manque de reproductibilité des études précliniques et permet d'optimiser la robustesse des résultats obtenus. . Le caractère unique de ce projet vient de sa réalisation simultanée sur différents sites avec des protocoles de TC et de s La notification d'autorisation de projet peut être préparée.uivi comportemental identiques sur tous les sites ainsi que la mise en place d'une banque de tissus et prélèvements.

Notre équipe utilisera un modèle de traumatisme crânien (TC) chez la souris peu invasif, nous permettant d'étudier sur le long cours, à l'aide de tests comportementaux et d'outils d'imagerie, les processus de neuroinflammation et de dégénérescence au niveau du système nerveux central avec une définition encore inaccessible chez l'homme.

De plus, ce modèle chez la souris nous permet de moduler le processus d'inflammation chronique du système nerveux central à l'aide d'une souche de souris transgéniques et ainsi d'envisager le développement de nouveaux traitements.

Suite à l'induction du TC, les animaux (souris sauvages et transgéniques) seront soumis à une évaluation comportementale par la réalisation de différents tests permettant d'évaluer leurs capacités locomotrices, leur niveau d'anxiété et leur mémoire. De plus, les animaux réaliseront également une imagerie IRM à différents temps post-TC afin d'évaluer les éventuels dommages causés par le TC. A la fin de l'étude les animaux seront sacrifiés afin de réaliser des études cellulaires sur le cerveau.

Le projet respecte et applique les exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement en matière d'expérimentation animale. Les procédures expérimentales décrites dans le projet impliquant le suivi longitudinal d'animaux réalisant des études comportementales et des imageries ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Le projet concerne 1728 souris. Ce nombre est réduit par l'utilisation d'un suivi longitudinal non invasif par imagerie et correspond au nombre minimum requis pour la réalisation de tests statistiques. Le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en œuvre uniquement par du personnel technique / de recherche formé et qualifié qui respecte la règle des 3R. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet et pour le garantir, les animaux sont hébergés selon les standards prévus par la réglementation : en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi (matériel de nidification, rouleau en carton et barre à ronger). Des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux. La procédure de traumatisme crânien a été validée par la vétérinaire désignée de l'établissement afin de garantir un protocole d'anesthésie/analgésie optimal ainsi que des soins post opératoires adaptés. Nous avons ainsi mis en place une surveillance accrue des animaux après induction du traumatisme afin de réagir et interrompre rapidement l'expérimentation si un animal montre des signes de souffrance.

12206 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) concerne 800 000 à un million de personnes en France et la fréquence d'apparition de la maladie augmente avec l'âge. La forme exsudative, qui se caractérise par l'apparition de vaisseaux anormaux sous la rétine (néovaisseaux), est la moins fréquente mais son évolution peut être particulièrement rapide et invalidante.

Bien que des traitements sont disponibles pour cette forme de la maladie (traitements « anti-VEGF ») depuis plusieurs années, ils ne permettent pas de bloquer complètement la maladie et nécessitent par conséquent des injections répétées dans l'œil. Ce type traitement (nombre d'injections répétées avec un risque potentiel), la durée du traitement et le coût pour le patient et la société dirigent les recherches vers des solutions thérapeutiques à longue durée d'action.

La thérapie génique est l'une des stratégies possible pour assurer une production continue et durable d'une protéine thérapeutique. Nous avons donc développé une thérapie non-virale par électrotransfert dans le muscle ciliaire de plasmide permettant l'expression dans l'œil de protéines anti-VEGF (appelées Protéines 9 et 10).

L'objectif de notre projet est donc d'évaluer l'efficacité anti-angiogénique de l'administration par électrotransfert dans le muscle ciliaire de plasmides codant la Protéines 9 ou 10 dans un modèle rongeur de néovascularisation choroïdienne, de préciser le profil d'expression de ces protéines dans l'oeil pour ainsi sélectionner la cible thérapeutique susceptible de pouvoir être administrée chez l'homme.

L'ensemble du projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation de 734 rats.

Ce projet a été développé en respectant la règle des 3R. Le modèle de néovascularisation choroïdienne (CNV) utilisé est le seul modèle expérimental permettant de démontrer l'efficacité de notre technologie, il n'existe pas de modèle in vitro représentatif de la néovascularisation choroïdienne. Par ailleurs, avoir recours à un oeil sur animal vivant est indispensable pour montrer que, via notre technologie, la protéine cible est efficacement produite, qu'elle diffuse depuis le muscle ciliaire jusqu'au tissu à traiter impliqué dans la pathologie et qu'elle exerce une action thérapeutique (protéine biologiquement active). Les procédures mises en place pour réaliser le projet sont peu traumatiques, de courte durée et sont réalisées sous anesthésies générale et locale (classe de gravité légère ou modérée). Des points limites ont été identifiés afin de minimiser l'inconfort, la souffrance ou la détresse potentiels des animaux et de mettre en place la conduite à tenir.

12207 De par sa position centrale au niveau de la face, le nez est primordial pour l'harmonie et l'éclat du visage. Les anomalies qui l'affectent ont des conséquences psychologiques, relationnelles et professionnelles. La reconstruction du cartilage nasal reste un défi pour tout spécialiste de chirurgie cervico-faciale. Les demandes pour remplacer les défauts cartilagineux sont en constante augmentation. De plus, comme le cartilage nasal ne se répare et que les techniques chirurgicales actuelles sont loin d'être idéales, ce tissu est un candidat idéal pour l'ingénierie tissulaire.

Une technique chirurgicale existe pour reconstruire au bloc opératoire la cloison nasale (aussi appelée septum) à partir du cartilage nasal du patient par fabrication d'une maquette cartilagineuse qui est réimplantée dans le nez. Cependant, cette technique nécessite qu'une certaine quantité de cartilage nasal soit encore disponible chez le patient ce qui n'est pas toujours le cas dans certaines situations (cancer, choc traumatique). Le projet vise à fabriquer un nouveau septum nasal par impression 3D d'une maquette poreuse combinée à un gel de cartilage. L'idée est de remplir les pores et de recouvrir la surface du matériau avec le gel, de façon à assurer une bonne tolérance de l'implant. Le gel de cartilage est créé en enrobant des cellules de cartilage (chondrocytes) issues du patient à traiter (autologues) dans un hydrogel, sous le contrôle de facteurs spécifiques sélectionnés.

La visée du projet est de substituer la maquette cartilagineuse (= assemblage de fragments de cartilage du patient) par une maquette prête à l'emploi et combinable au matériel cellulaire du patient amplifié et coulé en gel.

Des chondrocytes nasaux humains enrobés dans un hydrogel (2 types d'hydrogel seront testés) seront coulés dans une maquette poreuse (3 matériaux différents seront testés) afin de recréer un implant nasal mesurant au maximum 6 mm de largeur sur 14 mm de longueur et 2 mm d'épaisseur. Cet implant sera ensuite greffé en sous cutané chez la souris nude qui servira d'une part de réacteur physiologique pour la construction in vivo de cartilage nasal humain et permettra d'autre part de tester la résistance du cartilage reconstruit aux frottements de la peau.

Au total, 6 conditions différentes (3 matériaux différents pour la création des maquettes poreuses et 2 hydrogels différents pour la création du gel de cartilage) seront analysées par implantation chez la souris nude soit 6 groupes de 7 souris, donc 42 animaux au total.

Le type cellulaire utilisé est unique mais sera issu de patients différents. Le fait d'utiliser des cellules primaires humaines issues de patients différents explique le petit nombre de souris utilisé par groupe. En effet, les biopsies de cartilage humain récupérées sont de petite taille ce qui limite le nombre de cellules extraites. Par conséquent, dans la plupart des cas, un patient permet de générer un seul type implant. Ainsi, pour ce protocole, nous aurons besoin au maximum de 42 patients différents, ce qui représente une importante cohorte pour ce projet.

Remplacement : Les expériences in vivo sont une étape inévitable dans ce projet afin de tester, dans des conditions physiologiques, la stabilité de l'implant ainsi que sa résistance aux frottements générés par la peau.

Réduction : Les hydrogels et les biomatériaux que nous planterons chez la souris ont tous fait l'objet d'une étude in vitro. Pour chaque expérience, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en assurant la reproductibilité des résultats.

Raffinement : Au cours de la chirurgie, une injection d'anti-inflammatoire est réalisée 30 minutes avant anesthésie et un gel anesthésique local est appliqué sur la peau de la souris nude au site d'incision. Au cours des 48 heures post-chirurgie, les souris recevront un antalgique via l'eau de boisson. Les animaux sont hébergés dans une animalerie avec un accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. Un personnel qualifié s'assure du bien-être des animaux au quotidien. L'apparence physique, le comportement et la réponse à des stimuli externes sont observés quotidiennement. Le poids corporel des animaux est suivi chaque semaine.

12208 Les affections de la peau touchent près d'un tiers de la population française et représentent un problème émergent de santé publique. De nombreuses pathologies chroniques cutanées présentes chez l'homme sont dues à des anomalies structurelles et fonctionnelles de la barrière cutanée. Un tel dysfonctionnement accompagné de facteurs environnementaux agressifs, à une exposition aux UVs excessive et/ou à une réponse immunitaire inappropriée, conduisent à l'apparition de pathologies cutanées inflammatoires ou précancéreuses souvent sévères qui peuvent apparaître dès l'enfance et impacter la vie sociale et l'activité professionnelle.

Certaines de ces maladies, telles que l'eczéma, le psoriasis, ou la kératose actinique peuvent être reproduites chez l'animal afin de mieux les comprendre pour mieux soigner les patients. Les modèles rongeurs sont souvent utilisés en première intention pour les expérimentations in vivo et permettent de répondre à certaines questions posées malgré des différences structurelles et immunologiques évidentes avec la peau humaine. En revanche, le porc représente une espèce privilégiée du fait des nombreuses similitudes avec la peau de l'homme, ce qui en fait un modèle recommandé pour les études de tolérance, de cicatrisation et pour les évaluations de médicaments en général.

Les procédures expérimentales 2 à 4 décrites dans ce projet consistent à induire chez le porc certains symptômes clés d'une pathologie dermatologique induite, soit par l'application topique ou l'administration par voie générale d'un agent irritant, d'un agent biologique, soit par un petit acte chirurgical (incision, abrasion...) ou encore par une exposition contrôlée aux UVs. Les signes cliniques sont observés et quantifiés grâce à des outils de mesure adaptés et utilisés pour la plupart en médecine humaine. La caractérisation du modèle est complétée quand cela est pertinent par une évaluation plus poussée de la zone lésée par des analyses immunologiques et histopathologiques. Tous ces éléments d'évaluation permettent de challenger la pertinence du modèle et sa prédictivité vis à vis de la pathologie humaine étudiée.

La procédure 1 décrit une étude de pharmacocinétique chez le porc afin de connaître l'exposition du produit dans le sang et la peau.

Le bénéfice médical attendu de ce projet est important car il va permettre de démontrer l'activité de futurs médicaments ou de dispositifs médicaux dans des modèles de pathologies pour lesquelles les solutions thérapeutiques sont actuellement insuffisantes ou inexistantes.

Ces pathologies induites ne sont mises en place que si des modèles in vitro ou ex-vivo (cellulaires et tissulaires) ne permettent pas de répondre à la problématique et si l'utilisation de modèles murins n'est pas satisfaisante.

La réduction du nombre d'animaux est possible grâce à des procédures expérimentales adaptées : chaque animal est son propre témoin et plusieurs applications topiques sont possibles sur différentes parties du corps. Une utilisation répétée des animaux est possible après une période de repos permettant une récupération complète entre chaque étude.

Le raffinement des modèles animaux se traduit par l'utilisation d'une anesthésie générale lors de la réalisation d'une lésion cutanée et par l'administration au préalable d'un analgésique par voie systémique afin d'éviter toute souffrance ou stress de l'animal. Une tranquillisation, une anesthésie locale voire une anesthésie générale sont utilisées pour l'administration de certains traitements si nécessaire. Un conditionnement préalable des animaux ainsi qu'une surveillance particulière de leur comportement sont effectués tout au long de l'étude. Un enrichissement du milieu (ex : litière, balles, tapis) est mis en œuvre.

Sur la base de 10 études par an maximum incluant chacune 6 animaux par groupe maximum, et considérant que la moitié des animaux pourra être incluse dans au moins deux procédures expérimentales de ce projet, un effectif maximal de 150 porcs sur 5 ans est nécessaire pour la conduite de ce projet.

12209 Nous utilisons plus de 240 millions de tonnes de plastique par an et il est estimé que jusqu'à 10% de ces tonnages atteignent nos océans. La pollution de plastique dans le milieu marin est reconnue maintenant par les scientifiques comme une menace pour l'équilibre de ses écosystèmes. Il est alors surprenant de constater que la pollution de plastique dans les eaux continentales a été encore très peu étudiée, son impact sur les écosystèmes est largement méconnu. Sous l'effet conjugué d'une exposition au rayonnement solaire et de l'abrasion mécanique (vents, vagues ...), les débris de plastique se fragmentent en morceaux de plus en plus petits. Ainsi la taille des débris de plastique présents dans l'environnement couvre une large gamme (parfois du mètre à de la dizaine de centimètres jusqu'à la microparticule, voire la nanoparticule). L'objectif de ce projet est d'évaluer au niveau des eaux continentales les conséquences biologiques potentielles de cette pollution. Pour cela, le projet ambitionne de réaliser des tests d'écotoxicité, à partir de débris collectés dans l'environnement à des concentrations faibles couramment retrouvées dans l'environnement et sur des organismes tests appartenant à des groupes représentatifs des différents niveaux trophiques des eaux continentales (algues, larves de diptères et d'amphibiens). Les amphibiens sont de bons modèles dans le cadre d'études écotoxicologiques et leur pertinence d'utilisation a été montrée depuis plusieurs années (les stades larvaires sont particulièrement sensibles, ce qui en fait de bons indicateurs de la qualité des milieux et ce sont des animaux sédentaires qui sont de bons indicateurs des conditions locales). Les essais seront conduits en conditions de laboratoire sur des systèmes d'évaluation biologique déjà bien validés (tests ISO et OCDE) permettant de fournir des réponses écotoxicologiques en termes de toxicités aiguë, chronique et génétique.

Pour ce faire, l'ensemble des procédures impliquent l'utilisation de 9740 individus. Les procédures mises en œuvre impliqueront des individus adultes xénope, des larves de xénopes et de pleurodèles. Les Xénopes adultes seront uniquement utilisés à des fins de reproduction (stimulation hormonale de la ponte par injection sous cutanée de gonadotrophine) et ne seront jamais mis à mort mais réintégrés à l'élevage avec une durée minimale de temps de repos d'au moins 6 mois avant une prochaine stimulation. Les têtards des deux espèces d'amphibiens (st 50 xénope et 52 pleurodèle) seront exposés aux différents types de plastique, en aquarium (100 mL par larve) pendant des durées variables (12 à 21 jours) selon les aspects étudiés (cassures de l'ADN, métamorphose, croissance). Afin de réduire le nombre d'animaux, les expérimentations seront regroupées au maximum, les larves issues des pontes seront utilisées dans différentes procédures et les conditions témoins seront mises en commun. Le nombre d'animaux utilisés dans chaque procédure est calculé selon un minimum requis pour pouvoir conclure statistiquement sur de potentiels effets délétères. Du point de vue du raffinement, les conditions d'élevage et d'exposition des différents animaux seront strictement contrôlées en fonction des besoins physiologiques de chaque espèce et stade de développement afin de réduire le stress et la souffrance au maximum (exemple : période de repos après stimulation des reproducteurs). De même, un animal sera utilisé pour analyser de nombreux biomarqueurs. Enfin, une anesthésie est utilisée à chaque fois. Le recours à des animaux est nécessaire pour fournir une vision globale des effets de ces contaminants.

12210 Nous avons déjà montré que les poulains nés de juments primipares sont plus petits à la naissance et jusqu'à au moins 18 mois que les poulains issus de juments multipares. De plus, leur métabolisme glucidique est différent de celui des poulains issus de multipares. Comme on sait que l'excès de glucose et d'insuline dans le sang est associé au développement de lésions des articulations (ostéochondrose) chez le poulain, on pourrait avoir plus de lésions d'ostéochondrose chez les poulains nés de primipares, l'ostéochondrose étant un problème qui affecte près de 30% des poulains de sport.

Les travaux qui indiquent que les premiers poulains sont différents ont toutefois des biais importants : il est difficile de séparer l'effet de l'âge de la jument de l'effet de sa parité car les études comparent en général des juments primipares jeunes à des juments multipares plus âgées. De plus, nos travaux montrent que l'équilibre métabolique de la jument au moment de l'insémination influence le développement du poulain. Or, le métabolisme des juments qui sont inséminées durant la lactation (juments suitées, qui ont besoin d'énergie pour produire du lait) est certainement très différent de celui des juments vides au moment de l'insémination, ce qui induit aussi une incertitude quant aux comparaisons entre juments primipares et multipares (souvent allaitantes), mais aussi quant à l'effet de la lactation au moment de l'insémination chez les multipares sur le développement du poulain. Les effets de la parité, de la lactation au moment de l'insémination ou de l'âge de la jument sur la croissance du poulain peuvent avoir plusieurs origines. On sait dans les autres espèces que la réceptivité utérine peut varier en fonction de la parité et/ou de l'âge, ce qui peut affecter la qualité de l'embryon et sa capacité à développer un placenta efficace. Chez la jument, nous avons observé que le placenta des primipares jeunes était moins efficace que celui des multipares plus âgées. Enfin, il n'existe que très peu de données comparant la production laitière entre juments primipares et multipares.

La méconnaissance des effets réels de la parité, de l'âge et/ou de la lactation de la jument sur les performances du poulain nous empêche actuellement de proposer aux éleveurs des stratégies de supplémentation de la jument ou du poulain né de primipare avec des compléments alimentaires adaptés. On ne sait pas non plus s'il est plus judicieux de faire pouliner une jument avant sa carrière sportive ou de ne la mettre à la reproduction qu'à la fin de sa carrière sportive. De plus, comme les effets de la parité de la jument sur les performances du poulain n'ont pas été vraiment évalués, ce paramètre n'est pas pris en compte lors de l'évaluation génétique des animaux.

Dans ce projet, nous souhaitons évaluer de façon indépendante l'effet de la parité, de l'âge de la jument et de la lactation au moment de l'insémination sur :

- 1- les sécrétions de l'utérus qui permettent le développement de l'embryon avant la mise en place du placenta
- 2- l'embryon (expression des gènes du développement)
- 3- la fonction placentaire
- 4- La production laitière
- 5- la croissance, le métabolisme, l'apparition de lésions d'ostéochondrose

Nous utiliserons un maximum de 100 juments (20 juments maximum par lot) et leurs poulains (100) sur 5 ans ainsi que 3 étalons maximum. Ces juments sont conduites en élevage classique (au pré en troupeau l'été et en boxe individuel avec accès à un paddock durant la journée l'hiver). Les juments seront divisées en 5 lots (juments de 4-5 ans ou plus âgées (>7 ans) n'ayant jamais pouliné, ayant déjà pouliné mais n'ayant pas de poulain en lactation au moment de la collecte, ou allaitant un poulain). Pour chaque partie du projet, le métabolisme des juments sera caractérisé par leur mesure (poids et hauteur au garrot), une note d'état (observation de la jument), un test de tolérance au glucose (injection intraveineuse de glucose et prises de sang sériées pour une période de 3 heures). Leur alimentation sera suivie.

1 et 2 - Nous effectuerons des collectes d'embryons de 6,5 jours par la méthode non-chirurgicale utilisée classiquement en élevage. Avant la collecte par lavage de l'utérus, un tampon hygiénique sera inséré pendant 10 minutes dans l'utérus pour collecter le fluide utérin.

3- Des juments des différents lots seront inséminées. Une prise de sang par mois sera effectuée durant la gestation pour l'analyse des hormones et une journée sera utilisée pour un suivi chaque heure de la glycémie au cours de la journée. Au poulinage, nous collecterons les placentas pour analyse.

4- la production laitière sera estimée après mise à jeun du poulain (avec une muserolle) pendant 4 heures puis traite manuelle d'un quartier de la mamelle de la jument. Dans un deuxième temps, le poulain sera pesé juste avant la tétée, puis juste après, pour évaluer la quantité ingérée.

5- les poulains seront pesés et mesurés régulièrement jusqu'à l'âge de 18 mois. Des prises de sang seront effectuées tous les mois puis tous les 6 mois ainsi que des tests de tolérance au glucose (tous les 6 mois). Des radiographies des articulations seront effectuées par des vétérinaires à 6 mois et 18 mois pour évaluer les lésions d'ostéochondrose

Cette étude ne peut être effectuée que sur l'espèce cible (le cheval) et ne peut pas être remplacée par des méthodes alternatives. Les techniques proposées sont peu invasives et utilisées en routine en pratique vétérinaire. Les prises de sang successives seront effectuées après la pose d'un cathéter sur la veine jugulaire pour réduire la souffrance. Les animaux seront conservés sur la ferme et réutilisés pour d'autres expérimentations. Les échantillons prélevés seront mis à la disposition des autres utilisateurs de la ferme.

12211 La manipulation d'actinides, émetteurs alpha tels que le plutonium ou l'américium, par les travailleurs de l'industrie électronucléaire engendre un risque de contamination. Des contaminations internes suite à des blessures ont été signalées depuis la généralisation de l'utilisation de ces composés dans le monde. Les actinides ne traversent pas ou faiblement la première barrière de la cornée stratifiée d'une peau saine. Toutefois, une perte d'intégrité de cette barrière par blessure mécanique, chimique ou thermique, permet l'entrée de ces composés. Le type et la localisation de la blessure ainsi que les propriétés physico-chimiques du contaminant conditionnent leur comportement dans l'organisme.

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

Le présent projet permettra une amélioration de la prise en charge des personnes après contamination par blessure par des actinides. Ce projet ne peut pas être réalisé à l'aide des modèles cellulaires car les actinides sont retenus par différents organes cibles (os, foie) selon la nature du contaminant. Ce projet fait appel à 424 rongeurs, l'espèce pour laquelle le laboratoire possède déjà de nombreuses données permettant ainsi d'effectuer des comparaisons. Ce nombre a été réduit au minimum nécessaire. Il a été déterminé en fonction des différents protocoles de traitement à tester pour les différents contaminants. Le nombre d'animaux par groupe (6) a été obtenu d'après l'analyse des données du laboratoire afin d'avoir une puissance statistique acceptable.

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

12212 Les paraplégies spastiques héréditaires (SPG, pour «spastic paraplegia») ont en commun la dégénérescence de la voie cortico-spinale qui se traduit par des troubles moteurs. Notre équipe s'intéresse à la génétique de ces maladies et elle a déjà généré une souris knock-out (KO) pour le gène spg11 afin de mimer la paraplégie spastique de type 11. Plus récemment, nous avons identifié des mutations causales d'un gène en relation avec le métabolisme lipidique, CYP2U1, aussi appelé la paraplégie spastique de type 56.

A travers la création d'une souris KO, nous cherchons à comprendre le rôle physiologique de la protéine CYP2U1 et les conséquences de son absence sur le fonctionnement du système nerveux.

Deux aspects particuliers vont être étudiés 1) le rôle de cette protéine 2) les mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant à la mort neuronale. Nos techniques utilisent les approches comportementales, la neuroanatomie histologique, l'imagerie non invasive du cerveau ainsi que l'électrophysiologie cellulaire ou sur tranches de cerveau. La culture cellulaire de fibroblastes et de neurones de ces souris sera utilisée pour élucider certains aspects cellulaires et thérapeutiques abordables uniquement sur cultures. Plusieurs modèles de SPG ont déjà été générés avec succès chez la souris (dont un dans l'équipe) et ces modèles miment la pathologie humaine. En revanche, la culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas toutes les propriétés d'un trouble de transport sur de longues distances, comme c'est le cas du faisceau cortico-spinal. Enfin, la modélisation par ordinateur est inappropriée en l'absence d'éléments sur les mécanismes à étudier.

Nous respectons la totalité des recommandations l'article R.214.105 du code rural cité dans le décret 2013-18. Bien que les animaux ne puissent pas être remplacés dans nos expériences, nous prendrons les mesures nécessaires pour réduire leur utilisation, notamment la culture cellulaire. Avant tout prélèvement de tissu les animaux sont profondément anesthésiés à l'Euthaol (150 mg/kg). La culture cellulaire est un objectif double, elle permet de remplacer l'utilisation d'animaux. Nous contrôlerons, dans le but de raffiner nos expérimentations, sans cesse la colonie dans le souci permanent de réduire la douleur et améliorer leur qualité de vie par exemple en enrichissant leur milieu par du matériel de nidifications. Nous sommes convaincus que seuls de tels procédés nous permettront de produire un meilleur modèle des processus biologiques et pathologiques. Nous utilisons pour l'ensemble du projet 165 souris. Le nombre d'animaux donné est justifié en détail pour chaque protocole expérimental. L'ordre de ces procédures n'est pas fixe, il dépend de la production des lots d'animaux et donc ne suit pas une chronologie bien déterminée à l'avance.

12213 A : But du protocole expérimental:

Production d'anticorps sur mouton femelle après injection d'antigène avec rappel chaque mois.

B : Le choix de l'animal s'est fait car le mouton est un très bon modèle pour ce type de protocole, ce qui permet d'optimiser au mieux la production et d'utiliser un nombre réduit d'animaux.

Cette méthode appliquée sur mouton est une méthode validée, qui permet de satisfaire aux besoins, avec l'utilisation du nombre le moins élevé d'animaux possible.

Il n'y a pas de méthode substitutive.

C : Un prélèvement de sang une fois par mois permet de récupérer les anticorps concernés, un nombre de mouton adapté, pour des prélèvements légers, environ 10 moutons sur 5 ans.

D : la durée d'un protocole est de 12 à 24 mois, à la fin de ces protocoles les animaux sont gardés en vie dans le seul but de l'entretien du parc.

La durée de la phase de prélèvement est basée sur le temps pendant lequel la quantité d'anticorps récupérés est satisfaisante.

E) Les moutons sont hébergés dans une bergerie qui leur est dédiée, ne dépassant pas le nombre d'animaux recommandé, et avec accès sur 2 hectares de prairie.

F) Le rôle des personnels impliqués, dans le cas de ces protocoles : expérimentateur, vétérinaire, animalier et responsable de l'état sanitaire des animaux, est bien défini, un contrôle plus important après chaque manipulation est également défini pour les personnes directement concernés.

G) Les douleurs pendant le prélèvement et l'injection de rappel de l'antigène sont des douleurs moyennes. (car utilisation de Freund). Mise en place de points limites afin de limiter au maximum les douleurs éventuelles.

12214 Les cyanobactéries benthiques ont été impliquées depuis quelques années dans des épisodes de prolifération conduisant à des mortalités d'animaux liées à la production de neurotoxines, telle l'anatoxine-a et ses dérivés. Au début considéré comme étant restreint à des cas isolés sur de petits cours d'eau, des événements récents ont révélé que de nombreuses rivières de notre territoire, y compris les grands fleuves, peuvent potentiellement héberger de telles cyanobactéries benthiques

toxigènes. Cependant, même si les épisodes de toxicité aiguë n'ont pour l'heure été recensés que pour la faune domestique ou sauvage, l'analyse de la bibliographie montre que la question du transfert et de l'accumulation des anatoxines-a dans les chairs de poissons n'a pas encore été élucidée et qu'aucune étude n'a abordé le devenir de ces toxines après ingestion. Or, ces éléments sont nécessaires pour mieux estimer le risque pour l'homme suite à l'ingestion de ces puissantes neurotoxines que sont les anatoxines-a.

Dans ce contexte, l'objectif de nos travaux vise à estimer le potentiel toxique associé à la production d'anatoxines-a et de ses dérivés sur les cours d'eau français, à travers une évaluation des possibilités de transfert et d'accumulation des anatoxines-a dans les chairs de poissons afin d'apporter les éléments de réponse permettant l'évaluation des risques liés à la consommation Humaine par les institutions sanitaires.

Dans le cadre de l'étude de la toxico-cinétique des anatoxines dans les chairs des poissons qui pourraient être consommées par l'Homme, seules les expérimentations sur organismes vivants sont susceptibles de nous permettre d'évaluer les flux d'assimilation, de métabolisation et de dépuraison des anatoxines-a en fonction de quantités déterminées. Ce travail, se positionne dans le cadre d'une réflexion sur la réduction des organismes utilisés à des fins expérimentales et cherchent ainsi à optimiser le nombre d'organismes employés tout en assurant une qualité suffisante d'informations générées permettant de mener un raisonnement scientifique, étayant les hypothèses à tester. Les expérimentations seront effectuées avec un nombre de réplicats judicieux et suffisants (n=3 et n=5 pour les procédures 1 et 2, respectivement) pour permettre d'intégrer les aléas dus à la variabilité biologique expérimentale, tous en respectant la règle des 3R, notamment quant à la réduction des effectifs employés et le raffinement en travaillant les conditions d'élevage adaptées à l'espèce employée et non-stressantes comme recommandées par l'OCDE (guideline 240). Un effort particulier sera notamment apporté à la détermination des doses d'exposition optimales (suffisante pour observer la toxicocinétique des anatoxines-a, mais pas trop élevée pour limiter les effets délétères, en nous plaçant à des doses subaiguës, proches de la DL5). Après exposition, les anatoxines-a seront dosées et suivi dans le temps dans les différents organes du poisson, afin de déterminer différents paramètres toxicocinétiques. Ce sont au total 165 poissons qui seront exposés par voie orale aux différentes formulation d'anatoxines-a (anatoxine-a pure commerciale, extrait de cyanobactéries naturellement riches en anatoxines-a, ainsi que d'un autre extrait de cyanobactéries productrices de dihydroanatoxine-a). Notons que pour la dihydroanatoxine-a notamment, aucune donnée toxicologique n'a pour l'heure été produite, au niveau de communauté scientifique internationale, hors cette molécule a tout particulièrement été détectée lors des proliférations qui ont eu lieu au cours de l'été 2017 et qui ont par ailleurs causé la mort de nombreux animaux.

12215 L'objectif scientifique de ce projet de recherche transrationnelle est d'utiliser plusieurs techniques complémentaires de neuroimagerie fonctionnelle (imagerie par ultrasons ultrarapides, par résonance magnétique fonctionnelle ou tomographie par émission de positons) pour évaluer l'effet central de différentes combinaisons de médicaments psychotropes associés à des molécules agissant sur le réseau des cellules gliales, en comparaison avec les médicaments psychotropes seuls. Le second objectif du projet est méthodologique et vise à valider l'utilisation de la récente technique d'imagerie ultrasonore en pharmacologie en comparaison aux deux autres techniques de neuroimagerie classiques. Les résultats de ce projet permettront à la fois de vérifier si ces combinaisons de molécules induisent une réponse neuronale plus importante, et de mieux comprendre comment l'activité des médicaments psychotropes est modulée par l'interaction entre neurones et cellules gliales.

Trois différentes procédures de neuroimagerie apportant des informations distinctes et complémentaires vis-à-vis de l'activité neuronale seront effectuées : deux procédures légères d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle et de tomographie par émission de positons, et une procédure modérée d'imagerie fonctionnelle par ultrasons (cette procédure nécessitant chez le rat de devoir amincir l'épaisseur du crâne sous anesthésie et analgésie, afin d'améliorer le passage des ultrasons). Ce projet sera réalisé chez la souris et le rat, deux espèces pour lesquelles des

données précliniques sont déjà disponibles pour les molécules d'intérêt, ce qui permettra une comparaison directe avec nos résultats.

Application des 3 Rs :

Pour ce projet, nous utiliserons un maximum de 352 rongeurs sur 5 ans, ce qui nous permettra d'évaluer les effets de plusieurs molécules et association de molécules à différentes doses, au moyen de trois techniques de neuroimagerie différentes. Ces techniques permettent d'évaluer indirectement l'activité neuronale au moyen de mesures complémentaires et non redondantes telles que les variations de flux sanguin, de concentration locale d'hémoglobine oxygénée ou de consommation de glucose. Chaque animal sera utilisé pour quatre acquisitions pour l'une de ces techniques d'imagerie, afin d'être son propre contrôle permettant une réduction importante du nombre d'animaux global nécessaire au projet, tout en conservant un nombre d'animaux suffisant par condition expérimentale pour des analyses statistiques pertinentes.

Ce projet met en jeu l'administration de substances pharmacologiques et de techniques d'imagerie entièrement non invasives (à l'exception de l'imagerie ultrasonore chez le rat qui nécessitera une procédure modérée consistant à amincir le crâne de l'animal sous anesthésie et analgésie pour le passage des ultrasons). On n'attend pas d'effet néfaste particulier de ces procédures sur les animaux, à part d'éventuels signes de douleur accompagnant la procédure modérée ; l'état de bien-être de tous les animaux sera évalué par une grille de score avec actions correctives adaptées. A la fin du protocole, les animaux seront euthanasiés après avoir été utilisés pour un total de 4 acquisitions d'imagerie.

12216 La peur est une réponse adaptative et transitoire exprimée lorsqu'un sujet est exposé à un danger. Cependant, la peur peut devenir élevée et continue en absence de danger, devenant alors un trouble psychiatrique dénommé anxiété. Cette pathologie constitue la condition psychiatrique possédant la plus forte prévalence. Selon un rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) de 2007, 10,7% des hommes et 14,5% des femmes en France présentent des troubles d'anxiété généralisés. L'anxiété représente ainsi un coût sociétal et économique majeur.

Bien qu'une hypothèse propose que des dysfonctionnements des circuits de la peur soient la cause de l'anxiété, les substrats neuraux à l'origine de l'anxiété et de ses réponses comportementales et physiologiques demeurent incertains. Le projet vise ainsi à définir l'origine des réponses comportementales et physiologiques à l'anxiété, dont réponses cardiovasculaires et respiratoires. Cette étude portera sur une région cérébrale spécifique impliquée dans les troubles anxieux chez l'humain : le cortex insulaire, et aussi sur une région impliquées dans les réponses cardiovasculaires : l'hypothalamus latéral.

Au travers d'analyses de la connectivité, de manipulation de l'activité neuronale et de mesures physiologiques, nous avons pour objectif de mettre en évidence les altérations des circuits de la peur dans un modèle d'anxiété chez la souris.

L'objectif à plus long terme est de pouvoir envisager des stratégies de restauration de ces altérations chez les patients atteints de troubles anxieux.

Remplacer : Le projet porte sur une analyse de la connexion des neurones et de leurs propriétés de transmission d'informations au cours du comportement. Par conséquent cette procédure doit être effectuée chez des animaux vivants. Des méthodes telles que la culture cellulaire ne permettent pas la quantification des connexions neuronales, ni les mesures physiologiques tels que la fréquence cardiaque.

Réduire : Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux afin d'obtenir une analyse fiable (le nombre d'animaux estimé permet d'effectuer des tests statistiques) et complète de la connectivité et de l'activité des régions cérébrales d'étude. Nous utiliserons ainsi 304 animaux sur cinq ans.

Raffiner : Les animaux seront hébergés en cages collectives, afin de limiter le stress dû à l'isolement. Les cages seront également enrichies en nids de coton. Une surveillance particulière

sera adressée aux animaux en période péri-opératoire. L'acte chirurgical sera effectué dans des conditions de propreté maximales. Des analgésiques seront administrés en cas de douleur.

12217 L'hypertension pulmonaire est caractérisée par une élévation de la pression dans les artères pulmonaires. Les traitements actuels ne sont pas curatifs et cette maladie grave entraîne le décès des patients. Pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans cette maladie, nous travaillons déjà au laboratoire sur des modèles d'hypertension pulmonaire chez le rat, mais ces modèles ne reproduisent pas toutes les caractéristiques de la maladie humaine.

Nous souhaitons dans ce projet développer un nouveau modèle d'hypertension pulmonaire chez le rat combinant l'injection d'un produit appelé monocrotaline (MCT) et une exposition à une hypoxie chronique (c'est-à-dire soumettre les animaux à un manque d'oxygène dans l'organisme). Ces animaux devraient reproduire certaines caractéristiques plus proches de la maladie humaine que les autres modèles que nous utilisons actuellement. En effet, les altérations de la réactivité ainsi que l'inflammation sont plus intenses dans les artères pulmonaires dans ce modèle. De plus, le remodelage des artères pulmonaires est également accentué, avec notamment l'apparition de lésions appelées plexiformes, présentes dans la maladie humaine, mais absentes dans les modèles utilisés jusqu'à présent au laboratoire.

Pour développer ce modèle, les rats seront traités *in vivo* à l'aide du composé monocrotaline qui sera injectée par voie intrapéritonéale. Les animaux seront ensuite placés dans un caisson hypobare permettant de générer une hypoxie chronique pendant 4 semaines. A la fin de ce protocole, nous mesurerons *in vivo* la pression artérielle pulmonaire et le débit cardiaque chez ces animaux (procédure réalisée sous anesthésie). Les rats seront ensuite euthanasiés afin de prélever des organes pour des expériences *ex vivo* complémentaires.

Pour mettre en place ce nouveau modèle au laboratoire, la règle des 3R a été mise en place. En effet, l'utilisation d'animaux dans ces expériences est indispensable pour étudier l'hypertension pulmonaire, car les phénomènes développés dans la maladie sont complexes et ne peuvent être modélisés dans leur ensemble dans un système cellulaire *in vitro* (REPLACEMENT). Cependant, une planification précise des expériences a été établie afin de réduire au maximum le nombre d'animaux inclus dans cette étude, et nous proposons un projet portant sur 160 rats (REDUCTION). Une attention permanente sera portée au bien-être des animaux avant et tout au long du protocole, notamment en assurant leur surveillance quotidienne et un enrichissement adéquat du milieu : papier tressé, morceaux de bois, tunnels et maisons en carton (RAFFINEMENT). L'injection de monocrotaline n'est pas connue pour provoquer des douleurs, et la souffrance est considérée comme faible dans ce protocole. Toutefois, une surveillance des animaux sera réalisée après l'injection, de manière à détecter tout signe de stress et/ou de douleur. Si nécessaire, une administration d'antalgique sera réalisée dans un premier temps. En cas de souffrance ou de détresse persistante pour l'animal, une procédure d'euthanasie sera mise en œuvre. Les mesures du débit cardiaque et de la pression artérielle pulmonaire seront réalisées sous anesthésie afin d'éviter le stress et/ou la perception de la douleur, et les animaux seront euthanasiés sans réveil à la fin de ces expérimentations.

Suite aux résultats obtenus dans ces expériences, nous étudierons les mécanismes mis en jeu en travaillant sur cellules humaines en culture, ce qui nous permettra de ne pas utiliser d'animaux de cette partie de nos expériences.

12218 En Corse, on peut considérer trois espèces patrimoniales de poissons côtiers emblématiques à savoir le mérrou brun (*Epinephelus marginatus*), le corb (*Sciaena umbra*) et le denti (*Dentex dentex*). Ces trois espèces ont un statut de conservation et sont listées sur la liste rouge IUCN avec respectivement les statuts suivants : « En danger », « Vulnérable (évaluation régionale Méditerranée) » et « Vulnérable (évaluation globale) ». Elles sont considérées comme des espèces indicatrices au sens où leur abondance est indicatrice de la pression d'exploitation des ressources halieutiques aussi bien au niveau pêche professionnelle que pêche récréative. Les niveaux de connaissance pour ces trois espèces sont cependant tout à fait différents. Le mérrou fait l'objet

d'études sur sa biologie et son écologie depuis de nombreuses années alors que le niveau de connaissance sur le corb et le denti est extrêmement limité.

Ce projet utilisera la télémétrie acoustique afin d'obtenir des données de déplacement, rythmes d'activité, territoire vital, fidélité au site, territorialité et migration. 129 poissons sauvages (43 de chaque espèce) seront capturés et marqués (présente demande d'autorisation) à l'aide d'émetteurs acoustiques et suivis sur une période de deux ans (9 en tracking actif la première année et 120 en tracking passif sur deux ans). Les données obtenues en plus d'avoir un intérêt fondamental de compréhension du comportement d'espèces vulnérables, pourront nous permettre de capitaliser sur ces nouvelles connaissances acquises afin de proposer des mesures de gestion adaptées à la Corse.

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

– Remplacer : il est impossible dans le cadre de ce protocole de remplacer ces espèces par un autre modèle, l'intérêt du projet étant justement de comprendre le comportement de ces espèces.

– Réduire : le nombre d'individus marqués pour chaque espèce est minimal compte tenu de la nécessité d'avoir des effectifs suffisants pour obtenir une représentativité suffisante sur chaque année et des tests statistiques adaptés.

– Raffiner : Tout a été mis en place dans le cadre des procédures pour limiter la souffrance et le stress des animaux par des procédures d'anesthésie, d'asepsie et de chirurgie optimales et un temps de capture, marquage, remise en liberté réduit au maximum.

12219 Le contrôle des produits concernés par l'essai est réalisé dans le cadre de la procédure de libération européenne EBRP en vigueur et selon les référentiels réglementaires.

L'essai pyrogène chez le lapin est décrit à la Pharmacopée Européenne et dans le dossier du fabricant. Il s'agit de la méthode officielle de référence qui permet de vérifier l'absence de substances pyrogènes (susceptibles d'induire de la fièvre) dans les préparations destinées à être injectées. Cette méthode de référence a été validée par les laboratoires européens à partir d'essais collaboratifs pour éviter que chaque laboratoire ait à revalider les méthodes (souche d'animaux, nombre, administration, ...). L'essai consiste à mesurer l'élévation de température provoquée chez le lapin après injection intraveineuse d'une solution stérile du produit à contrôler. Dans la mesure du possible notamment résultat négatif aux produits à l'essai, nous réutilisons les lapins après essais, ce qui permet de diminuer le nombre total de lapins utilisés. Les animaux sont hébergés dans des cages disposant d'enrichissements adaptés et seront sortis des essais s'ils ne supportent pas la contention et si ils ont des fortes fièvres. La nourriture et l'eau de boisson sont contrôlés et disponibles ad libitum.

Cette saisine est demandée pour une durée de 5 ans et, en se basant sur le programme prévisionnel 2018, utilisera environ 80 lapins/an soit 400 lapins.

12220 1. Objectifs scientifiques du projet

L'objectif de ce projet est de tester des molécules bioactives, extraites de plantes et développées par une entreprise, qui ont pour propriété de stimuler le processus de réparation de la peau, comme observé en tests cellulaires. Pour cela, leur action sera analysée in vivo en utilisant le modèle de régénération de la nageoire caudale du poisson zèbre. Le poisson zèbre est un modèle animal très utilisé en biologie, en particulier pour étudier la régénération de tissus et d'organes. En effet, il possède des capacités de régénération remarquables contrairement aux mammifères, dont l'Homme, dont les capacités de régénération restent très limitées. Le poisson zèbre adulte est ainsi capable de régénérer une partie du cœur, de la rétine, de la moelle épinière, du cerveau et des nageoires après amputation. Le projet sera plus particulièrement ciblé sur les conséquences sur les protéines de la matrice extracellulaire. Certains collagènes sont notamment impliqués dans le processus de régénération et représentent des marqueurs du derme et de l'épiderme.

Des lignées mutantes, ainsi que des lignées sauvages, seront utilisées pour étudier l'impact des molécules bioactives sur la régénération de la nageoire caudale, et plus particulièrement leurs effets sur la peau qui recouvre entièrement cet appendice.

2. Retombées attendues

Le but est de montrer l'impact de molécules bioactives, testées au préalable en culture cellulaire, dans la régénération de la peau en utilisant pour cela le modèle du poisson zèbre. Le rôle de ces molécules sera caractérisé à différentes étapes de la régénération de la peau.

3. Conformité par rapport aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Il n'existe pas à l'heure actuelle de système in vitro capable de mimer tous ces processus et l'étude de la régénération nécessite donc l'utilisation d'un modèle animal. Cependant, les molécules bioactives ont été déjà testées au préalable sur des cultures de cellules humaines.

Le nombre de poissons utilisés dans les procédures expérimentales associées à ce projet est réduit au minimum afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables. Ce nombre est également en adéquation avec un projet antérieur portant sur la régénération de la queue caudale du poisson adulte.

Des points limites sont fixés afin de réduire la souffrance des animaux qui est évaluée à un niveau léger (absence de signes généraux évocateurs de mal-être : poissons restant au fond du bac, sans bouger, sans se nourrir, accélération de la respiration branchique etc).

4. Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

246 poissons maximum au total.

12221 Pour synchroniser les chaleurs et les ovulations chez la chèvre afin de réaliser une insémination artificielle, les filières d'élevage utilisent des traitements hormonaux qui comprennent une phase progestative sous la forme d'une éponge vaginale imprégnée d'un analogue (FGA) de la progestérone (P4) laissée en place une dizaine de jours. Cette imprégnation permet l'expression d'un comportement d'œstrus et la mise en place d'un cycle de durée normale après l'ovulation. Mais ces traitements à base de stéroïdes de synthèse ne sont pas utilisables en élevage biologique et sont de plus en plus contestés dans les élevages en général. Nous avons donc entamé un programme d'exploration de la présence de progestérone à l'état naturel dans un certain nombre de plantes, leur utilisation étant alors autorisée dans les élevages ci-dessus mentionnés. Nous avons mis en place des mesures sur une plante de nos campagnes potentielle candidate à utiliser pour une distribution orale.

Le programme consiste donc à mesurer l'efficacité clinique sur le comportement d'œstrus et l'ovulation des préparations mentionnées, dans les conditions de la pratique sur des chèvres dans un troupeau en production.

Ce programme s'étalera sur 5 ans durant lesquels nous serons amenés à tester 8 groupes de 10 animaux, soit un total de 80 chèvres.

Ce projet respecte la règle des 3R comme suit :

- Remplacement: la complexité de la digestion ruminale et du métabolisme des stéroïdes dans l'organisme ne peut pas être remplacée par des systèmes alternatifs.
- Réduction: le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé afin de ne pas utiliser plus d'animaux que nécessaire, tout en conservant une bonne mise en évidence statistique.
- Raffinement: Les animaux seront hébergés en groupe social sur paille et avec enrichissement (disque à mordiller ou caisse en bois pour grimper) et le nombre de prises de sang permettra de mettre en évidence l'effet recherché. Compte tenu des variations entre côtés de prélèvement (gauche/droite) pour certaines hormones les prélèvements seront tous réalisés du côté droit.

12222 Le cancer est à l'heure actuelle un enjeu de santé publique mondiale. L'immunothérapie anticancéreuse apparaît comme une stratégie prometteuse, bien que dans certains cas, son efficacité soit limitée. En effet, les cellules tumorales peuvent envoyer de nombreux signaux aux

cellules qui les entourent afin par exemple, d'empêcher le système immunitaire de reconnaître et détruire la tumeur. De plus, il apparaît que certaines chimiothérapies, en plus de tuer la tumeur, peuvent interférer avec le système immunitaire positivement ou négativement, empêchant ce dernier de lutter de manière optimale contre la tumeur.

Des anticorps dirigés contre une protéine, sécrétée par de nombreuses tumeurs et qui inhibe les réponses immunitaires ont été développés. Ainsi, le but de ce projet est de mesurer l'effet anti tumoral (ralentissement de la croissance tumorale, désinhibition du système immunitaire) de ces anticorps. Les résultats obtenus dans des modèles expérimentaux *in vitro* suggèrent que ces anticorps ne suffiront sans doute pas à eux seuls à permettre la destruction complète de la tumeur. Néanmoins, ils pourraient coopérer avec d'autres traitements, tels que la chimiothérapie, ou des anticorps ciblant directement des molécules impliquées dans les réponses immunitaires. Les anticorps développés seront donc testés seuls, ou en combinaison avec des thérapies désormais utilisées couramment en clinique.

Ce projet pourrait alors permettre d'améliorer l'efficacité des traitements existants et notamment pour les patients qui actuellement ne répondent pas aux immunothérapies en aidant le système immunitaire à vaincre la tumeur.

Bien que différentes expériences aient été au préalable réalisées *in vitro* afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, ni les modélisations mathématiques, ni les systèmes *in vitro* ne permettent de reproduire le contexte global de la croissance tumorale. Il est donc nécessaire de mener ce projet dans l'animal vivant, ici la souris qui est le modèle animal le plus probant. Pour l'ensemble du projet, le nombre de souris nécessaires faisant l'objet de la présente demande sera de 2884 souris.

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi et suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être. Lorsque cela est nécessaire des méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'anxiété des animaux seront utilisées. Les expérimentations seront arrêtées avant la souffrance des animaux selon des points limites listés dans une grille de score. Toutes les précautions seront prises pour réduire le nombre d'animaux utilisés, tout en assurant une valeur significative des résultats obtenus. Chaque animal sera utilisé pour analyser plusieurs paramètres des cellules du système immunitaire et de la tumeur, ce qui permettra d'optimiser les données obtenues sur chaque animal.

12223 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative du neurone moteur adulte la plus fréquente (2 à 3 nouveaux cas pour 100 000 habitants/an). A ce jour, elle reste incurable et fatale. La SLA présente des formes sporadiques et familiales ; parmi ces dernières environ 20% des cas découlent de mutations des gènes Sod1, Fus et Chmp2B. Sur cette base génétique, diverses lignées de souris transgéniques ont été mises au point, qui reproduisent les principaux symptômes de la maladie et sont à la base des recherches précliniques menées à l'heure actuelle dans le domaine de la SLA.

A l'échelle cellulaire, la SLA se caractérise par la dégénérescence de deux types de neurones moteurs : les neurones corticospinaux, localisés dans le cortex cérébral et qui connectent le cerveau à la moelle épinière, et les neurones moteurs bulbaux et spinaux, situés dans le tronc cérébral et la moelle épinière et qui relaient les informations du cerveau vers les muscles striés squelettiques.

Malgré cette description clinique précise, les recherches précliniques se sont jusqu'à présent focalisées sur les neurones moteurs bulbaux et spinaux, faisant des neurones corticospinaux, les « grands oubliés » de l'échiquier de la SLA. Face aux échecs répétés des essais thérapeutiques, la question du rôle des neurones corticospinaux dans le déclenchement et la progression de la SLA apparaît plus que jamais pertinente.

L'objectif de ce projet de recherche est développer une stratégie de régénération des neurones corticospinaux au sein du cerveau de souris développant la SLA (Sod1G86R), et de leurs contrôle sauvages. En injectant simplement un virus génétiquement modifié, ou des neurones corticospinaux embryonnaires au sein du cortex cérébral des animaux, nous allons chercher à déterminer :

1) si de nouveaux neurones corticospinaux peuvent être générés au sein du cerveau de souris adultes, y survivre et s'intégrer dans le réseau existant,

2) si des neurones corticospinaux exogènes peuvent être transplantés au sein du cerveau de souris adultes, y survivre et s'intégrer dans le réseau existant.

Cette étude concerne un total de 124 animaux sur une durée de 5 ans.

Cette approche est conforme à la règle des trois R:

Réduction:

- l'étude proposée n'a jamais été réalisée auparavant, et ne consiste donc pas une répétition d'autres études ;

- l'étude proposée sera réalisée sur un nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour générer des données fiables, ne nécessitant pas de répétition ultérieure ;

- l'étude proposée impliquera des souris mâles et femelles, pour 1) limiter le nombre de portées générées, 2) parce que la SLA affecte aussi bien les hommes que les femmes et 3) parce qu'il n'y a pas de raison de penser que les expériences proposées pourraient être affectées par le sexe des animaux.

Raffinement:

- l'étude a été pensée de manière à limiter au maximum l'inconfort ou une douleur éventuelle des animaux ;

- les souris étant des animaux grégaires, elles seront laissées entre individus issus d'une même portée (mâles et femelles seront malgré tout séparés) afin de leur permettre de maintenir les interactions sociales qui limitent un potentiel stress ou mal-être des animaux. Les animaux seront maintenus dans des cages offrant un environnement enrichi, leur permettant 1) de s'isoler sous du matériel polycarbonate et/ou au sein de nids construits à partir de coton prévu à cet effet, et 2) de ronger. Lors des chirurgies, une anesthésie gazeuse sera utilisée grâce à l'emploi d'un masque adapté aux rongeurs, et la température des animaux sera maintenue par l'emploi d'un tapis chauffant. Enfin, la couverture analgésique sera optimale, grâce à la combinaison d'analgésiques locaux et systémiques.

- Remplacement: dans le domaine de recherche sur la SLA, le modèle animal le plus pertinent est à l'heure actuelle la souris. L'utilisation d'invertébrés comme la drosophile ou le nématode se heurte à une organisation du système nerveux qui n'a pas la complexité requise et ne permet pas de répondre aux questions cliniques posées.

12224 La goutte est une maladie inflammatoire du sujet âgé et représente à l'heure actuelle l'arthrite la plus fréquente chez l'adulte. Favorisée par l'âge, la prise d'alcool et les excès alimentaires, cette maladie est notamment en pleine expansion dans les pays occidentaux (USA : 4% des adultes) mais aussi dans les pays émergents (Chine, Taiwan). Cette pathologie se caractérise principalement par des crises inflammatoires, très douloureuses, au niveau des membres inférieurs (pieds, genoux) mais parfois aussi à d'autres localisations (articulations des mains). Souvent récidivante, elle peut être la source d'un handicap grandissant dans la mesure où l'inflammation peut devenir chronique si les patients ne sont pas traités ou si les traitements sont insuffisants.

La goutte est causée par la formation de cristaux d'urate de sodium (MSU, MonoSodim Urate Crystal en anglais) lorsque l'acide urique sanguin augmente. Cette hausse est le plus souvent la résultante de prédispositions génétiques et/ou d'excès alimentaires (boissons sucrées, alcools, fruits de mer, etc.) ou encore de certaines situations pathologiques (insuffisance rénale). Cependant, si la cause de la goutte (les cristaux de MSU) est désormais bien connue, le mécanisme inflammatoire et son déclenchement demeure nettement plus obscur.

Des études réalisées ont montré que la réponse inflammatoire était causée par une molécule dénommée interleukine 1 bêta (IL-1 β). Libérée par différents types de leucocytes (globules blancs) dans l'articulation concernée au contact des cristaux de MSU, l'IL-1 β est ainsi capable de causer les différents symptômes typiques de la goutte (rougeur, douleur vive, gonflement de l'articulation) ; toutefois, cette molécule ne peut être libérée par les leucocytes sans être au préalable activée par

une autre molécule. En 2006, certains auteurs ont montré, in vitro, que la molécule NLRP3 était capable de réaliser cette étape d'activation, toutefois, ces résultats n'ont jamais été clairement montrés chez l'animal et certaines études semblaient même montrer que NLRP3 n'avait pas de rôle déterminant dans la goutte in vivo. Ainsi, au vu de ces interrogations, décrire l'importance de ce facteur et isoler la molécule impliquée dans l'activation de l'IL-1 β constituerait une avancée majeure dans le domaine.

Il est également important de noter que la goutte est à l'heure actuelle une pathologie survenant chez des patients âgés et bien souvent porteurs d'autres pathologies (comorbidités) graves comme des insuffisances rénales (près de 30% des patients) et des pathologies cardiovasculaires (hypertension artérielle, insuffisance cardiaque, obésité et surpoids, diabète sucré). Ces patients atteints de goutte possèdent alors des contre-indications pour les traitements anti-inflammatoires (corticoïdes, anti-inflammatoires non stéroïdiens, colchicine). Peu d'alternatives existent à ce jour pour ces patients et les agents bloquants spécifiquement l'IL-1 β (utilisés en remplacement des anti-inflammatoires plus classiques) sont associés à un coût extrêmement élevé. Ainsi, trouver de nouveaux moyens thérapeutiques est également un enjeu majeur afin d'améliorer la prise en charge de ces patients, toujours plus nombreux.

Le projet comporte au total 12 procédures et utilise au maximum 972 souris. L'objectif est de maintenir et créer des lignées de souris génétiquement modifiées pour identifier les acteurs de l'inflammation articulaire tout en observant au maximum la règle des "3R" :

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire a été estimé au minimum mais néanmoins suffisamment pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente. Une étude exhaustive des données récentes de la littérature n'a pas permis d'identifier une équipe réalisant des expériences similaires.

Raffiner: Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale et des points limites spécifiques ont été déterminés pour éviter toute souffrance animale et justifier un arrêt de l'expérience en cours. Les procédures sont réalisées sous anesthésie et le suivi des animaux est quotidien (weekend et jours fériés inclus). Les souris sont maintenues en groupe de 2-3 par cage pour maintenir une interaction entre individus et l'environnement des cages est enrichi à l'aide de copeaux dans les litières et de fibres de coton pour la construction des nids ; les souris ont accès ad libitum à la nourriture et à de l'eau.

Remplacement: Les données générées in vitro dans la littérature antérieure n'ont pas permis d'élucider clairement les différents acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la physiopathologie de la goutte (incohérence entre les résultats in vitro et in vivo). Seul le modèle animal - couplé au maximum avec des études de culture cellulaire - permettra dans notre cas de répondre à ces questions complexes.

12225 L'infection à *Mycobacterium ulcerans*, ou ulcère de Buruli, est une maladie négligée émergente, représentant la troisième mycobactériose après la tuberculose et la lèpre chez les sujets immunocompétents. Cette infection, qui touche principalement les enfants, est diagnostiquée principalement dans les zones humides de l'Afrique de l'Ouest et Centrale. Les lésions cutanées débutent généralement par un nodule qui évolue en une ulcération qui s'étend dramatiquement. Malgré leur étendue, les lésions ne sont pas douloureuses. Le caractère indolore des lésions est attribué à la mycolactone, toxine produite par le bacille, responsable aussi des signes cliniques cutanés. Il a été montré que la mycolactone exerçait un effet analgésique en se fixant sur le récepteur à l'angiotensine II (AT2R), conduisant à une hyperpolarisation neuronale médiée par l'activation du canal potassique TRAAK. Il s'agit désormais de déterminer le rôle d'AT2R et de TRAAK dans la survenue de dommages cutanés, dans le contexte d'une infection avec *M. ulcerans*. Chez l'homme, lorsque les lésions induites par *M. ulcerans* ne sont pas traitées, celles-ci peuvent évoluer vers un processus spontané de cicatrisation. De récents travaux ont mis en évidence que des souris FVB/N inoculées par *M. ulcerans* présentent des lésions identiques à celles observées dans les souches C57Bl/6 et Balb/c, mais évoluent vers une cicatrisation. Ces travaux mettent en exergue l'existence de facteurs génétiques de susceptibilité à l'infection par *M. ulcerans*. Une étude de génomique comparative entre les souches C57Bl/6, Balb/c et FVB/N a révélé que les souris

FVB/N, contrairement aux autres souches murines, étaient déficientes pour un récepteur couplé aux protéines G nommé GPR84. À ce stade, et au vu de l'importance des résultats obtenus in vitro, il est essentiel de déterminer si GPR84 est un acteur principal de l'initiation de la cicatrisation spontanée ou si GPR84 joue un rôle dans la physiopathologie de l'infection à *M. ulcerans*. Seule l'utilisation de modèles animaux développés spécifiquement pour notre étude pourra répondre à cette question. Dans ce but, nous avons obtenu des animaux transgéniques (souris C57Bl/6 déficientes pour GPR84). L'utilisation de ces souris nous permettra de démontrer formellement le rôle de GPR84 dans la physiopathologie de l'infection à *M. ulcerans* et d'identifier les acteurs cellulaires et moléculaires sous-jacents.

De la même façon, IRG1 (Immune-Responsive gene 1 ; aussi appelé Acod1) a été identifié comme un gène d'importance dans la susceptibilité à l'infection par *M. tuberculosis*. Cette enzyme mitochondriale est à l'origine de la production d'itaconate aux propriétés bactériostatiques. IRG1 a été mis en évidence comme ayant un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire pathologique et responsable des dommages pulmonaires associés à la progression de la tuberculose. Une mortalité augmentée des souris déficientes en IRG1 est reportée, comparativement aux souris wild-type, associée à une aggravation de l'infection et du processus inflammatoire.

Ainsi, il s'agit dans ce projet d'étudier la contribution de différents facteurs génétiques de l'hôte, GPR84, AT2R et TRAAK, ainsi que IRG1, à la pathogénicité de *M. ulcerans*, et de mettre en évidence les voies de signalisation mises en jeu lors d'une infection par *M. ulcerans*, en comparant la susceptibilité de souris immunocompétentes et knock-out dans la réponse à une épreuve virulente de *M. ulcerans*.

Un nombre total de 480 souris sera nécessaire à ce projet (en Annexe 1 : Tableau Récapitulatif du nombre d'animaux utilisés).

De façon à réduire le stress, l'inconfort et la douleur, les souris ne seront pas soumises à des traitements ou des prélèvements répétitifs. De plus, la surveillance sera quotidienne, afin de détecter l'éventuelle morbidité le plus tôt possible (changement de comportement, prostration, tremblement, aspect physique externe). Les souris seront sacrifiées au maximum 90 jours post-infection. Mais si des signes de morbidité étaient observés, les points de cinétiques seront revus et réajustés, les individus seront euthanasiés et les analyses prévues.

12226 Les neurones communiquent en sécrétant des messagers chimiques appelés neurotransmetteurs. Ces messagers sont stockés à l'intérieur de la cellule dans des vésicules spécialisées qui, en fusionnant avec la périphérie cellulaire, libèrent les neurotransmetteurs au bon moment et au bon endroit. Ce processus, appelé exocytose, est à la base de la neurotransmission (transmission d'un message entre 2 neurones).

Bien que de nombreuses données aient été générées quant aux protéines impliquées, le rôle des lipides au cours de la neurotransmission est très peu exploré.

Nos données récentes montrent que les lipides sont indispensables au bon fonctionnement de la neurotransmission. En particulier, nous avons montré que la production et la localisation spécifique de certains lipides (nommés acide phosphatidique et phosphatidylsérine) sont importantes. Aujourd'hui, nous disposons de deux lignées de souris génétiquement modifiées pour lesquelles ces aspects sont altérés, et nous voulons en étudier l'impact sur les comportements nociceptifs et douloureux, ainsi que sur l'initiation et/ou le développement de douleurs chroniques.

A terme, ces données permettront de mettre en évidence, pour la première fois, l'importance des lipides dans les circuits de transmission de la douleur et dans la physiopathologie des douleurs chroniques.

Le projet nécessitera 640 animaux et sera conduit en respectant la règle des 3R visant à réduire le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures. Les souris mâles et femelles seront étudiées en proportions équitables dans le cadre de ce projet.

Remplacer

Au vu de notre objectif d'étude, il nous est malheureusement impossible de remplacer notre modèle in vivo par un modèle in vitro ou in silico. En effet, la caractérisation de la douleur nécessite une observation comportementale, uniquement possible chez l'animal vivant et vigile.

Réduire

Les expériences seront réalisées avec la volonté de réduire autant que faire se peut le nombre d'animaux par condition expérimentale, mais toujours dans l'optique d'obtenir le maximum d'information scientifique par test. Ainsi, au regard des données de la littérature et de la variabilité phénotypique individuelle, les groupes expérimentaux seront constitués de 10 animaux. Toujours dans l'idée de diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés, chaque procédure regroupe un ensemble de tests comportementaux dont l'enchaînement est compatible avec le bien-être de l'animal, ce qui permet de réduire grandement l'effectif.

Raffiner

Un point limite est fixé pour chaque test nociceptif utilisé au-delà duquel la stimulation nociceptive est arrêtée en absence d'une réaction de l'animal. Les animaux sont hébergés dans des animaleries dont le fonctionnement a été conçu pour maximiser le confort et limiter la souffrance des animaux. En particulier, les souris sont hébergées en cohorte, elles font l'objet d'observations régulières tout au long de l'expérience, l'enrichissement est systématiquement appliqué à toutes les cages. Les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout signe d'inconfort ou de stress. En cas de nécessité des décisions seront prises en accord avec le vétérinaire, la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux (SBEA) et/ou le personnel zootechnique de l'institut pour stopper tout signe de mal-être de l'animal.

12227 Déoxynivalenol en tant que facteur de risque pour les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : détoxification chez l'homme et impacts sur le microbiote et l'homéostasie intestinale

Le déoxynivalénol (DON) est une toxine produite par un champignon qui contamine les céréales et les produits céréaliers. L'exposition alimentaire à cette toxine peut provoquer chez l'homme vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, maux de tête, étourdissements et fièvre.

Les concentrations en DON dans les aliments peuvent parfois dépasser les valeurs seuils journalières tolérables définies dans la réglementation européenne n°1126/2007 et l'étude sur l'alimentation totale en France (EAT2) montre que ces concentrations augmentent par rapport à l'étude précédente (EAT1).

Au niveau intestinal, il a été démontré que le DON affecte les défenses immunitaires clés telles que la barrière intestinale ou la production de mucus. Le DON est connu également pour avoir des interactions avec les bactéries du tractus digestif. Certaines sont capables de métaboliser le DON, rendant la molécule moins toxique pour l'organisme alors que d'autres peuvent, en sa présence, produire des composés génotoxiques jouant un rôle dans les processus inflammatoires.

Ces observations suggèrent que le DON pourrait avoir un rôle dans le processus physiopathologique complexe conduisant au développement des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI).

Nous proposons donc d'étudier la réciprocity des effets intestinaux du DON sur la composition du microbiote intestinal humain, le métabolisme du DON et les conséquences de son exposition en termes d'homéostasie immunitaire chez des personnes en bonne santé et chez des personnes atteintes de MICI. Cette étude se déroulera chez un modèle de rongeur, dépourvu de bactéries depuis sa naissance (axénique), en particulier au niveau du tractus digestif. Les souris seront maintenues dans des isolateurs stériles et seront inoculées avec une flore fécale humaine issue de patient en bonne santé ou de patient atteint de la maladie de Crohn (MICI). Elles seront exposées oralement à des concentrations sub-chroniques de DON (100 µg/kg poids corporel/j). Cette dose est la NOAEL c'est à dire la dose sans effet nocif observable établi à partir des études toxicologiques sur le DON chez la souris.

1-Remplacement : à l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle cellulaire suffisamment développé et performant permettant de reproduire l'environnement cellulaire complexe du tube digestif et du

microbiote intestinal humain in vitro. Le modèle animal à flore humaine est le seul modèle qui permette d'étudier in vivo l'influence d'une molécule toxique sur le processus inflammatoire d'un malade atteint de MICI.

2-Réduction : l'effectif a été calculé de manière à garantir une fiabilité statistique suffisante tout en réduisant au mieux le nombre d'animaux en fonction des variables étudiées. Le nombre total d'animaux impliqués dans cette étude sera de 96 souris axéniques. Chaque expérimentation comprendra 4 groupes de 6 souris et aura une durée maximale de 2 mois. L'expérimentation sera réalisée 4 fois pour évaluer la variabilité de réponse en fonction de la composition de la flore fécale humaine.

3-Raffinement : La flore fécale humaine d'un donneur en bonne santé ou d'un donneur atteint de la maladie de Crohn sera administrée par voie orale aux animaux par du personnel expérimenté et habitué à manipuler en isolateurs stériles. L'inflammation intestinale supposée se développer chez les souris après l'administration de la flore MICI sera sans douleur pour l'animal car elle ne devrait pas entraîner de colite.

Les animaux recevront quotidiennement par voie orale pendant 1 mois une solution aqueuse ou une solution de DON aux concentrations sans effet toxique observable. Des prélèvements d'excréments seront effectués 2 fois par semaine au cours de l'expérimentation par stimulation anale. Les animaux auront accès à la nourriture et à l'eau à volonté. Un enrichissement de l'environnement est prévu. Des prélèvements tissulaires seront effectués sur les animaux euthanasiés en fin d'expérimentation.

12228 La myopathie myotubulaire est une maladie congénitale très sévère des muscles squelettiques. Cette pathologie affecte 1 garçon sur 50 000, n'a aucun traitement et conduit dans la majorité des cas au décès prématuré du patient. Elle est due à des mutations dans le gène Mtm1 qui code pour la myotubularine, une protéine essentielle pour le fonctionnement du muscle. Dans la pathologie, l'absence de myotubularine entraîne une désorganisation de l'architecture intracellulaire des fibres musculaires, et une faiblesse musculaire, qui affecte aussi les muscles respiratoires. La détresse respiratoire est très sévère et est à l'origine du décès des patients.

Dans un projet antérieur, nous avons développé un médicament qui montre une efficacité thérapeutique sur un modèle murin. Dans ce projet, nous optimiserons ce produit pour en augmenter l'efficacité thérapeutique. Nous ramènerons au sein des cellules musculaires le gène de la myotubularine afin de compenser le défaut génétique et de corriger la fonction musculaire. Ce gène sera apporté à la cellule à l'aide d'un transporteur appelé vecteur AAV. Nous injecterons trois produits différents qui contiendront le gène Mtm1 avec différents éléments pour réguler et renforcer son expression.

Nous vérifierons que le produit optimisé est plus efficace, et que la dose nécessaire pour traiter la maladie est réduite par rapport au médicament précédent. Une des limitations de la thérapie génique étant la difficulté à produire en grande quantité les vecteurs, l'utilisation de notre nouveau produit devrait permettre de traiter les patients atteints de myopathie myotubulaire à plus faible dose, et donc de traiter plus rapidement un plus grand nombre de patient, à un prix inférieur. L'utilisation d'animaux est indispensable pour faire des preuves de concept thérapeutiques, car les modèles cellulaires de la maladie ne permettent pas d'étudier les défauts liés à la fonction du muscle (perte de force non mesurable sur des modèles cellulaires, pas de remplacement possible). A l'opposé, le modèle de rat qui sera utilisé dans ce projet reproduit la pathologie musculaire avec fidélité. Il permet de mesurer dans le temps et de façon prédictive de la clinique (c'est-à-dire chez l'homme) l'efficacité des traitements sur l'ensemble des tissus.

Afin de raffiner nos études, un aliment hydratant et nourrissant sera placé au sol dans la cage afin de faciliter l'accès aux rats malades. En cours de protocole, des anesthésiques seront administrés au moment des prélèvements de sang et de muscle, et lors des tests de mesure de force qui se font sur animal vivant en fin de protocole.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans cette étude, les mêmes rats seront utilisés pour les tests moléculaires et les tests histologiques. Le nombre de rats nécessaire a été estimé 10 rats

par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes). Les rats seront élevés et reproduits dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 1.5 ans et nécessitera l'utilisation totale de 92 rats.

12229 Le syndrome d'Ehlers-Danlos est une maladie humaine rare qui touche principalement les tissus conjonctifs les rendant trop lâches entraînant des problèmes dans la motricité ainsi que des luxations à répétition. Le projet consiste en l'obtention d'une lignée de souris modèle du syndrome d'Ehlers-Danlos par croisement de deux souches de souris génétiquement modifiées déjà existantes au laboratoire. Il s'agit des souches invalidées soit pour le gène codant la fibromoduline soit pour le gène codant pour la lumicine.

2

Ces deux gènes codent pour des molécules de soutien présentes dans les tissus musculo-squelettiques. Le développement et l'utilisation de ce modèle d'étude double KO ont été publiés en 2002. Les souris invalidées pour les deux gènes (fibromodulin et lumicine) présentent un phénotype dommageable non léthal concrétisé par un trouble de la marche ainsi que des tendons ayant des propriétés biomécaniques altérées ce qui est caractéristique du syndrome d'Ehlers-Danlos de type hypermobile. Nous reproduirons le modèle décrit sans aucune autre modification. Les souris invalidées pour la fibromoduline seule présentent également un phénotype dommageable non léthal,....

Durant les 5 années du projet, nous produirons un total 45 souris. Concernant le phénotype dommageable, seuls les animaux de plus de 6 mois développent une fibrose tendineuse douloureuse. C'est la raison pour laquelle ces derniers seront mis à mort avant 6 mois afin de prévenir toute souffrance.

Notre expérimentation est conforme avec la règle des 3R car nous avons prévu d'utiliser un nombre minimal de cages d'accouplement. Afin de segmenter les différentes utilisations des animaux, ce projet concerne uniquement l'élevage de ces souris modèles, leur utilisation dans un protocole thérapeutique fera l'objet d'une seconde demande d'autorisation. Les expérimentations in vivo ne seront réalisées qu'après validation et maîtrise des protocoles thérapeutiques développés dans notre laboratoire.

12230 Le pronostic vital et fonctionnel des patients en neuro-réanimation est lourdement engagé en cas de lésions cérébrales aiguës. Dans cette population, l'inflammation liée à des infections secondaires et particulièrement pulmonaires est directement mise en cause dans l'aggravation des lésions cérébrales des patients. Pour lutter contre ces infections et donc cette inflammation, une antibiothérapie est nécessaire chez les patients de neuro-réanimation et les céphalosporines de 3ème génération (C3G) sont généralement prescrites. Ces molécules sont d'autant plus intéressantes, qu'elles présentent en plus de leurs propriétés antibiotiques, des propriétés neuroprotectrices démontrées expérimentalement par la modulation de l'expression du transporteur cérébral du glutamate GLT-1. L'objectif du projet à terme sera d'évaluer la relation entre les concentrations des antibiotiques et leur effet neuroprotecteur sur l'expression du GLT-1 de deux C3G chez le rat dans un contexte inflammatoire. L'objectif de cette procédure consiste en une étude préliminaire de mise au point du modèle inflammatoire chez le rat par administration de lipopolysaccharides. Cette procédure nécessite l'utilisation de 78 rats mâles Sprague Dawley.

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

-«Remplacer». La réponse inflammatoire que nous souhaitons mimée est une réponse inflammatoire cérébrale dans sa globalité qu'il n'est pas possible de reproduire dans un modèle in vitro.

-«Réduire». Une étude statistique a été utilisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux permettant d'obtenir une puissance statistique suffisante dans le traitement des résultats.

-«Raffiner». Le suivi quotidien des animaux permet d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement du rat (agressivité/apathie), cris, mobilité, alimentation... Le poids corporel sera mesuré tous les jours. L'ensemble de ces critères sera pris

en compte dans une grille d'évaluation du bien-être de l'animal qui permet d'anticiper et de mettre fin au mal être animal précocement.

Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi (rouleaux de papier, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

12231 Le carcinome basocellulaire (CBC) est le cancer le plus fréquent dans le monde. La chirurgie ou la radiothérapie sont généralement très efficaces. Même si les cas de CBC avancés ou métastatiques, qui ne peuvent plus être traités par chirurgie ou radiothérapie, sont peu fréquents, ils sont associés à une mortalité importante. De nouveaux agents thérapeutiques ont récemment été produits notamment le Vismodégib. Malgré son efficacité, il induit des effets indésirables conduisant fréquemment à la suspension ou l'arrêt du traitement. La dose de médicament généralement prescrite peut être optimisée pour réduire ses effets indésirables. Cependant nous connaissons encore mal aujourd'hui tous les effets indésirables du Vismodégib et nous manquons de modèles expérimentaux animaux de CBC humains chez les animaux.

L'objectif de notre projet est d'identifier une dose de Vismodégib qui soit efficace avec des effets secondaires réduits.

Dans cette étude nous prévoyons d'administrer le Vismodégib par gavage ou dans l'eau de boisson chez des souris greffées avec des cellules tumorales pour identifier les doses efficaces. Les effets secondaires induits par le Vismodégib sont étudiés dans une autre saisine.

Ce projet durera 5 ans et requerra 94 souris. Pour suivre la règle des 3R, la réduction du nombre d'animaux est prise en compte en limitant le nombre de souris par groupe au minimum requis pour avoir une signification statistique des résultats.

Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux est pris en compte de leurs naissances à leurs morts. A ce titre, l'environnement des animaux est enrichi avec des nids. De plus, les souris sont hébergées par groupe de 5 dans des cages ventilées et les animaux sont surveillés quotidiennement. Les expériences nécessitant des injections ou prélèvements seront effectuées sous anesthésie générale.

En raison de la complexité des acteurs impliqués dans le développement tumoral et les problèmes de biodisponibilité du médicament l'approche in vitro est inutilisable. Il est donc indispensable d'utiliser un modèle expérimental in vivo. La souris est l'animal le plus petit des mammifères permettant une telle étude. Dans cette étude, le CBC sera localisé (non métastatique).

12232 Objectif du projet :

Les maladies du cerveau représentent un problème majeur de santé publique. La découverte de candidats médicaments et leur développement sont connus pour être très longs. La situation est encore plus dramatique pour les composés ciblant le système nerveux central ; en effet, le taux d'accès à la première administration chez l'homme et au dépôt de dossier d'autorisation de mise sur le marché est significativement plus faible que pour d'autres axes thérapeutiques. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le système nerveux central exige une évaluation précise du mode d'action et de la neurotoxicité des composés en développement. Cette information doit être obtenue le plus tôt possible afin de remédier aux situations d'échecs au stade du développement clinique. Le manque d'efficacité et la présence de phénomènes inattendus de neurotoxicité sont les principales causes d'échec des projets de R&D pharmaceutiques au stade des essais cliniques. Il est donc important de développer une stratégie précoce permettant d'apprécier l'efficacité après le passage cérébral et d'évaluer la neurotoxicité d'un candidat médicament.

Ainsi, l'objectif de ce projet est de tester l'efficacité/la neurotoxicité de composés en développement.

Pour ce faire, nous procéderons à l'administration de composés sur des rongeurs (souris et rats) sauvages. Les modifications du réseau neuronal induites par l'administration unique ou répétée des composés par voie entérale (orale) ou parentérale (intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée,

intramusculaire) seront évaluées, après la période d'administration, par des enregistrements électrophysiologiques sur coupes cérébrales.

Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera 3030 rats et 5050 souris.

Avantages :

Ce projet scientifique associé à notre plateforme d'électrophysiologie ex vivo (sur coupes cérébrales) permettra de tester les effets neurotoxiques/neuroprotecteurs de composés en développement. La technique utilisée sera l'électrophysiologie ex vivo, c'est-à-dire sur coupes cérébrales. L'électrophysiologie est une technique très puissante qui permet l'enregistrement de l'activité électrique à l'échelle d'un réseau de neurones ou de neurones isolés.

Dommmages escomptés :

Suite à l'administration des composés à tester, il se peut que des signes d'inconfort ou d'intolérance se manifestent. Dans ce cas, les points limites préalablement définis et adaptés à chaque mode d'administration permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces et adaptées en cas de souffrance animale.

Méthodes alternatives (principe de remplacement) :

L'étude du système nerveux, de par sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et ainsi aboutir au développement de nouvelles thérapies pour des pathologies neurodégénératives. Nos expérimentations seront réalisées chez le rat ou la souris ; ces rongeurs, de petite taille et d'élevage facile, possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

Nombre et type d'animaux, conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement) :

-réduction : le nombre de rongeurs utilisé a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Sur un même animal, nous pourrons enregistrer simultanément différents paramètres électrophysiologiques (plasticité synaptique, transmission synaptique de base, activité neuronale). L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

-raffinement : les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (jouets, copeaux de bois à grignoter, contact visuel entre les animaux, musique, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum. Avant les expériences, les animaux seront acclimatés pendant une période d'au moins 5 jours. Dès que l'administration des composés débutera, une observation journalière des animaux sera mise en place. Des points limites préalablement définis et adaptés à chaque mode d'administration permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de leur bien-être (souffrance, stress, angoisse). En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée. Si les signes de souffrance persistent, les animaux seront mis à mort.

12233 L'arsenal thérapeutique dont dispose le clinicien pour freiner le développement de la leucémie aiguë myéloïde (LAM) reste, encore à ce jour, limité à l'utilisation de molécules de chimiothérapie qui ne permettent pas malheureusement d'éradiquer cette maladie. Ainsi, environ 60% des patients présentent des leucémies résistantes au traitement conventionnel ou rechutent après la première ligne de traitement. Il apparaît donc crucial d'identifier les aspects moléculaires et fonctionnels impliqués dans la résistance des cellules leucémiques aux chimiothérapies conventionnelles, en utilisant les modèles de transplantation de LAM combinés à une approche de criblage à grande échelle afin d'identifier les acteurs moléculaires clés responsables de la chimiorésistance. Au terme

de notre projet, les résultats obtenus devraient contribuer à l'amélioration des traitements proposés aux patients. Notre projet s'articule autour de 2 axes :

L'objectif 1 est d'identifier les gènes qui participent à la chimiorésistance de quatre modèles transplantables de LAM arborant des altérations géniques fréquemment retrouvées dans la pathologie humaine. Dans ce cas, nous injecterons par voie intraveineuse des cellules tumorales de souris à des souris receveuses préalablement irradiées (cette étape permet de faire de la place en vue de la greffe des cellules tumorales). Les souris seront ensuite traitées par injection intrapéritonéale avec des molécules de chimiothérapie utilisées en clinique humaine.

L'objectif 2 consiste à développer un modèle préclinique par xénogreffe de cellules de LAM humaines réfractaires aux traitements chimiothérapeutiques conventionnels dans des souris immunodéficientes (injection par voie intraveineuse ou sous-cutanée de cellules tumorales à des souris éveillées dépourvues de système immunitaire, évitant ainsi le rejet de greffe). Cela permettra de tester de nouvelles drogues ciblant les gènes candidats identifiés dans l'objectif 1 et qui seront susceptibles d'améliorer les effets de la chimiothérapie, tout en minimisant sa toxicité globale.

Afin de répondre aux différentes questions adressées, nous appliquerons le principe de la «règle des 3R». Nous réaliserons le plus possible d'expériences avec des modèles in vitro, seules les expériences absolument indispensables seront réalisées in vivo en optimisant au maximum la méthodologie employée en fonction des résultats obtenus par les approches in vitro. Nous avons réduit le nombre de souris utilisés au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique. Nous ferons en sorte de regrouper au maximum les conditions à tester afin de réduire au minimum le nombre d'animaux. L'expérience de notre équipe dans l'utilisation de ces modèles, la multiplicité des paramètres mesurés, l'utilisation des méthodes statistiques adaptées nous permettront une exploitation maximale des données obtenues par expérience afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser (3600 souris pour les 5 ans que durera ce projet). Nous aurons recours autant que possible à des techniques d'imagerie non invasive (réalisée sur souris anesthésiées) pour le suivi rapproché des animaux afin de réduire le nombre de souris utilisées et aussi privilégier leur bien-être. Une attention toute particulière sera également portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément à celle des expérimentateurs. Nous veillerons, par ailleurs, à réduire au minimum l'intensité et la durée des souffrances ressenties par les animaux, en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence physique, le poids et le comportement des animaux. Les souris présentant des souffrances, des douleurs et/ou des angoisses (atteinte du point limite) seront euthanasiés selon la méthode réglementaire. Le suivi des souris en expérimentation se fera sur une période maximale de 6 mois, à l'issue de laquelle tous les animaux seront euthanasiés.

12234 Notre projet propose d'étudier les effets de la relaxine 3 dans le contrôle de la sensibilisation douloureuse. Ce peptide est synthétisé dans une région précise du cerveau appelée Nucleus Incertus mais il est ensuite libéré dans de nombreuses aires cérébrales où il influence un grand nombre de fonctions physiologiques. Nous avons montré lors d'expériences préliminaires que la relaxine-3 injectée dans le cerveau avait des effets analgésiques significatifs. Nous allons maintenant nous attacher à préciser les voies nerveuses qui sont affectées par la Relaxine-3 chez des animaux contrôles. Des animaux seront ensuite soumis à une douleur inflammatoire chronique modérée sur 4 jours, obtenue par injection intra-plantaire de l'adjuvant de Freund, un modèle d'études couramment utilisé au sein de notre équipe. Nous étudierons alors les modifications des voies nerveuses impliquées dans le rôle de la Relaxine-3, ainsi que les mécanismes de transmission de la douleur dans la moelle épinière. A l'aide d'enregistrements électrophysiologiques, nous chercherons si l'injection intracérébrale de Relaxine-3 produit un effet dans la moelle épinière qui pourrait expliquer la diminution du comportement douloureux chez la souris.

Dans notre étude, la réduction du nombre d'animaux est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique (hétérogénéité interindividuelle), le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas ainsi 15 animaux par groupe. La réalisation

de ce projet nécessite l'utilisation de 110 souris. Le recours au modèle animal est indispensable car ce projet nécessite une évaluation comportementale.

Pour les procédures où cela est nécessaire, un antalgique sera donné. Les animaux seront surveillés quotidiennement jusqu'à la fin de l'expérimentation.

12235 Le cortex entorhinal médian (CEM) joue un rôle fondamental dans l'intégration de trajet, une stratégie de navigation spatiale qui se base essentiellement sur l'utilisation d'informations issues du mouvement de l'animal. Il a été proposé que cette capacité repose sur l'activité de différents types de neurones du CEM, codant spécifiquement la position de l'animal dans l'espace, l'orientation de sa tête et la vitesse de ses mouvements. L'activité de toutes ces cellules est modulée par les oscillations dans le potentiel de champs dans la bande theta et plusieurs études ont montré que ces oscillations sont dominantes lorsque l'animal est dans une phase active d'exploration ou de locomotion. Il est donc possible que les oscillations theta coordonnent l'intégration des informations issues du mouvement de l'animal au sein du réseau neuronale du CEM. Afin de tester cette hypothèse nous proposons: 1) d'analyser les effets induits par le blocage de ces oscillations theta du CEM dans des tâches d'intégration de trajet, et 2) de corrélérer l'amplitude et la fréquence de ces oscillations du CEM avec la performance des animaux lors des réponses correctes et incorrectes. Ces différentes expériences nous permettront de mieux comprendre le rôle du cortex entorhinal dans la navigation

spatiale ainsi que les mécanismes neuronaux responsables de ce processus.

Le nombre total d'animaux qui sera utilisé dans toutes les expériences ne dépassera le nombre de 30. Nous mettrons en œuvre différentes stratégies expérimentales afin de respecter la règle des 3R :

Raffinement & Réduction: Dans la première expérience afin d'analyser les effets induits par le blocage des oscillations theta, nous allons utiliser une stratégie expérimentale qui permet de réduire de la moitié le nombre d'animaux utilisés. Au lieu d'utiliser deux groupes d'animaux, l'un injecté avec la substance active (muscimol) et l'autre injecté avec une substance neutre (solution physiologique), nous utiliserons un seul groupe d'animaux. Chaque rat subira donc une injection de muscimol et une injection de saline afin de comparer son comportement dans les deux conditions. Les deux injections seront espacées de deux jours afin d'éviter des possibles effets cumulés. Cette pratique présente deux avantages: le premier est de réduire drastiquement le nombre d'animaux utilisés (Réduction) ; le deuxième est que chaque animal devient son propre contrôle, ce qui augmente la fiabilité des résultats obtenus (Raffinement).

Dans la deuxième expérience nous utiliserons des dispositifs multi électrodes ce qui permet de maximiser le nombre de signaux enregistrés et donc d'augmenter la force statistique des résultats tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés (Raffinement). Les animaux seront soumis au protocole expérimental par groupe de 7/8, et le deuxième groupe sera testé seulement après vérification des résultats obtenus par le premier groupe. Cette stratégie permet de réduire potentiellement le nombre total d'animaux utilisés (Réduction). La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale, les paramètres vitaux (respiration, fréquence cardiaque, température corporelle) contrôlés constamment et la douleur prise en charge par analgésie durant toute la manipulation.

Remplacement : Les rats représentent le modèle privilégié dans ce type d'études car ils sont dotés de grandes capacités d'orientation dans l'espace. Ils ne peuvent être remplacés dans ce projet car ce dernier comporte de méthodes invasives d'enregistrements intracrâniens qui ne sont par exemple pas compatibles avec des approches chez l'humain.

12236 Développé dans le cadre d'un Laboratoire International Associé (LIA) ce projet porte sur une espèce endémique de Tasmanie : le diable de Tasmanie (*Sarcophilus harrisii*), un marsupial carnivore, dont la population est décimée depuis 22 ans par un cancer transmissible : le Devil Facial Tumor Disease 1 (DFTD1). Ce cancer est à l'origine un cancer des cellules de Schwann qui se transmet par morsure. Il a décimé 90 % de la population entraînant un risque d'extinction de l'espèce et son

classement sur la liste rouge (espèce en danger) de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN). Alors que certains diables commençaient à développer une résistance au DFTD1, en 2014, une nouvelle variante a été décrite, le DFTD2. Les enjeux de conservation sont donc considérables pour cette espèce endémique. Trouver un biomarqueur précoce (avant que les tumeurs externes ne soient détectables) permettrait en effet de détecter très en amont la pathologie. Cet outil serait d'une importance cruciale en conservation, afin d'isoler avec certitude les individus sains du reste de la population. Compte tenu du statut IUCN de l'espèce, il n'est pas envisageable d'infecter un diable de Tasmanie pour trouver un biomarqueur précoce. Aussi est-il nécessaire d'avoir recours à un modèle animal pouvant se substituer au diable de Tasmanie. Le modèle murin est privilégié car c'est un des modèles traditionnellement utilisé en cancérologie et l'injection de cellules DFTD a déjà été réalisé par d'autres équipes.

Pour se faire, nous utiliserons un total de 45 souris immunodéprimées de type nude pour notre expérience pilote auxquelles nous injecterons en subcutanée les cellules cancéreuses de diables de Tasmanie. Dans le but de détecter un biomarqueur précoce, nous développerons deux techniques : le prélèvement d'odeurs et l'étude du profil protéomique des individus avant et après injection de cellules cancéreuses. Plusieurs travaux scientifiques récents ont en effet montré que les pathologies s'accompagnent de modifications d'odeurs corporelles et que le cancer n'échappe pas à cette règle. Nous avons ici recours à deux procédures différentes afin de maximiser les chances de trouver un biomarqueur précoce. La protéomique présente l'avantage de ne pas nécessiter de prélèvement supplémentaire lors des captures de diables de Tasmanie sur le terrain, en revanche cette technique est assez onéreuse. Concernant la technique de prise d'odeurs, elle est non invasive et peu onéreuse mais il faut trouver un signal fort afin de pouvoir discriminer la molécule signal parmi les différentes molécules sur le terrain. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous réaliserons notre expérience pilote en utilisant des animaux que d'un seul sexe : des femelles. Ce cancer touchant indistinctement les deux sexes nous avons choisi le sexe femelle traditionnellement plus utilisées en expérimentation animale compte tenu de leur caractère plus docile. Pour le bien-être des individus, les volumes sanguins prélevés seront faibles afin de permettre au sang de se régénérer. De plus, les cages d'hébergement présenteront des enrichissements.

12237 Après un Accident Vasculaire Cérébral (AVC) certains patients présentent des pertes de mémoire, bien qu'ils ont récupéré leurs facultés motrices. D'après un sondage auprès de patients et de médecins ces troubles sont un enjeu prioritaire de recherche pour améliorer la vie après un AVC.

Nous souhaitons évaluer l'efficacité de nouvelles stratégies de stimulation cérébrale profonde pour traiter les troubles de la mémoire après AVC. La stimulation cérébrale profonde consiste à délivrer via une électrode intracérébrale de faible quantité d'électricité dans une région du cerveau. Ce traitement est validé pour des maladies affectant le mouvement comme la maladie Parkinson. Il est en revanche toujours en cours d'étude pour traiter les problèmes de mémoire tels qu'ils peuvent survenir dans la maladie d'Alzheimer. Dans ce cadre, la structure cérébrale stimulée s'appelle le fornix. Il s'agit d'une véritable "autoroute" reliant les régions du cerveau impliquées dans la mémoire. Dans notre étude nous testons la stimulation du fornix chez le rat après un AVC. Il s'agit d'un nouveau mode de stimulation qui permet d'adapter en temps réel le courant délivré à l'activité cérébrale de l'animal qui est enregistrée en direct. Le modèle d'AVC chez le rat est un modèle validé avec une très faible mortalité. Les opérations seront réalisées sous anesthésie générale. Pour l'insertion d'électrodes, l'animal sera anesthésié et sa tête sera fixée dans un appareil permettant d'insérer les électrodes avec précision dans les régions d'intérêt. La douleur postopératoire sera dépistée avec une échelle d'expression faciale et traitée avec des pommades sur les cicatrices et des traitements antalgiques (paracétamol et dérivés de la morphine). Les animaux récupèrent en quelques jours une capacité de déambuler et de s'alimenter. Chaque animal sera euthanasié à la fin des expériences. Tout animal montrant des signes de souffrance majeure sans efficacité des traitements antalgiques et/ou incapable de s'alimenter avec perte de poids >15% en 3 jours et/ou incapable de réaliser les exercices sera euthanasié avant la fin des expériences afin d'éviter toute souffrance.

Nous prévoyons de mener notre recherche en quatre étapes. La première étape est de valider la faisabilité des chirurgies. Le modèle d'AVC est produit en réalisant une occlusion de trois artères alimentant le cerveau. Des injections intra cérébrales d'un produit anesthésiant seront également réalisées pour inactiver temporairement une région du cerveau. La deuxième étape est d'enregistrer l'activité électrique cérébrale avec une électrode intracérébrale chez des animaux sains, des animaux avec AVC et des animaux avec inactivation temporaire d'une région cérébrale. La troisième étape, une fois que nous serons certains des résultats des première et deuxième étapes, consiste à réaliser une implantation d'électrodes de stimulation cérébrale chez des rats après AVC. La quatrième et dernière étape consiste à évaluer l'efficacité de la stimulation cérébrale sur la mémoire de rats après un AVC. Les rats seront soumis à des tests non douloureux visant à apprécier leur mémoire (détection d'un nouvel objet, souvenir de l'emplacement d'un liquide sucré). Respect la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement des expériences)

Remplacement : notre sujet nous oblige à recourir à l'expérimentation animale. Nous ne pouvons remplacer par un autre modèle car le rat est le modèle de référence pour étudier l'ischémie cérébrale et la mémoire spatiale.

Réduction : nous avons réduit le nombre total d'animaux utilisés à 104 (en comptant un taux d'échec des chirurgies de 30%)

Raffinement : le fait de procéder par étapes permet de rationaliser l'utilisation des animaux. En effet il ne serait pas éthique de réaliser d'emblée l'implantation d'électrodes d'enregistrement si le modèle d'AVC n'est pas au point. Idem, il ne serait pas logique d'implanter des électrodes de stimulation, si nous n'arrivons pas à procéder à des enregistrements de qualité.

12238 Pour éclairer les recommandations visant à rééquilibrer les apports en protéines à la fois qualitativement (origine végétale ou animale) et quantitativement dans la nutrition chez l'homme, notamment des pays occidentaux, il est nécessaire de comprendre les processus cognitifs et neurophysiologiques mis en jeu par la consommation de protéines. Ces processus puissants, assurant les apports en acides aminés essentiels, sont encore mal connus. Très conservés au cours de l'évolution, ils reposent sur un apprentissage robuste des meilleures sources protéiques et intègrent un ensemble complexe d'informations cognitives, sensorielles, digestives, et énergétiques en interaction avec les circuits de la récompense et de la décision.

Notre objectif est de caractériser les systèmes de détection et d'apprentissage de la teneur en protéines d'un aliment. Pour cela, nous explorerons les mécanismes neurobiologiques mis en jeu par l'ingestion de protéines chez le rongeur, et leur rôle dans le déclenchement du rassasiement et de la satiété. Nous soumettrons les rongeurs à des régimes chroniques différents selon leur teneur en protéines (faible, normale ou forte), et selon la source de protéines (végétale ou animale). Les rongeurs seront ensuite exposés ponctuellement à un repas test qui diffère du régime habituel par le nutriment présenté (protéine, graisse, sucre, normal) ou par sa composition en acides aminés (normal, dépourvu en un acide aminé, pourvu en un seul acide aminé). Nous utiliserons des approches comportementales (critères de satisfaction et bien-être : vocalises, aptitude au jeu) couplées à des mesures physiologiques (calorimétrie) et des explorations neurophysiologiques (activité électrique des centres nerveux) in vivo pour identifier l'implication, dans le système nerveux central, des relais des voies sensorielles, digestives et homéostatiques contribuant à l'activation des processus de récompense-décision, en réponse à l'ingestion de ces différents régimes. Nous compléterons ces expériences par la recherche de marqueurs des neurones et des cellules gliales dans les structures nerveuses candidates. Ils seront mis en évidence par des approches d'immunohistochimie et biochimie.

Aucune modélisation in vitro ne permet aujourd'hui d'étudier les interactions complexes entre les différentes régions cérébrales impliquées dans le comportement et la satisfaction alimentaires, ni leur mise en jeu au cours de la prise alimentaire ; ni les activations neuronales et gliales qui les sous-tendent. L'utilisation du modèle rongeur, bien établi et couramment employé, est nécessaire pour avancer sur la compréhension de ces mécanismes (Remplacement).

Le nombre d'animaux utilisés pour ce projet sera au maximum de 1108 rats. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés et sont nés et élevés en captivité. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire tout en restant suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Le bien-être des animaux est assuré durant l'élevage par leur suivi quotidien. Ils sont hébergés dans des cages enrichies. Des critères d'arrêt d'expérimentation ont été déterminés et seront appliqués afin d'empêcher toute souffrance. Les méthodes d'anesthésie, d'analgésie et d'euthanasie ont été validées par le vétérinaire référent et la structure bien-être (Raffinement). Les rongeurs étudiés dans les tests comportementaux seront inclus dans les autres procédures (Réduction).

12239 En recherche fondamentale ou avancée, les produits sanguins issus d'animaux peuvent être utilisés pour des tests *in vitro*, des cultures de cellules sanguines, etc. Cela permet des avancées scientifiques, en limitant l'utilisation directe d'animaux en expérimentation à des procédures peu invasives et peu douloureuses, et ainsi de suivre les principes de réduction et de raffinement en expérimentation animale.

La proximité phylogénétique des primates non humains avec l'homme en fait des modèles animaux particulièrement valables pour reproduire des pathologies humaines. L'utilisation de produits sanguins de primates est donc de premier intérêt pour la recherche.

Le projet a pour but de répondre aux besoins de la communauté scientifique en produits sanguins de primates non humains (*Macaca spp*, *C.aethiops* et *C.jacchus* notamment) pour ces travaux *in vitro*. Le projet se limite à des prélèvements sanguins sur des animaux hébergés dans notre établissement.

Les prélèvements sanguins sont effectués à la veine fémorale généralement sous anesthésie générale. Les volumes et la fréquence des prélèvements respectent les recommandations EFPIA/ECVAM. La fréquence de prélèvement est généralement mensuelle. Le nombre de prélèvements est estimé à une moyenne de 100 par mois.

Les produits sanguins sont ensuite préparés selon les demandes (préparation de plasma, de sérum, congélation pour stockage,...) avant d'être envoyés aux centres de recherche utilisateurs.

12240 Les enfants porteurs de mutations inactivatrices de gènes de la famille Usher naissent sourds et sont progressivement atteints de cécité à l'adolescence (syndrome Usher). En effet, ces gènes sont importants pour le développement des tissus sensoriels de l'oreille moyenne et de l'œil. Une mutation équivalente chez la souris, entraîne la surdité des souriceaux mais ils ne deviennent pas aveugles, la structure rétinienne étant différente dans cette espèce. Le développement d'un modèle animal reproduisant tous les symptômes du syndrome Usher est important pour comprendre les mécanismes d'apparition de la cécité suite à la mutation et pour mettre au point des méthodologies de thérapie génique permettant de contrer l'effet de la mutation sur la vision. Aujourd'hui, l'utilisation d'outils moléculaires performants permet de créer des délétions mimant des mutations naturelles de manière précise et efficace. Cette technologie sera utilisée pour réaliser l'inactivation des gènes Usher 1 (harmonine) et 2 (Myosine 8) chez le porc. Afin de minimiser le nombre d'animaux à utiliser pour générer les lignées mutées, ces séquences sont d'abord testées sur cellules porcines en culture (Réduire). Les séquences les plus efficaces (Raffiner) seront ensuite testées sur des embryons produits *in vitro* à partir d'ovocytes collectés sur des ovaires d'abattoir (Remplacer). Chaque essai comportera 7 donneuses (Large White) d'embryons au stade une cellule et trois receveuses (Meishan) d'embryons mutés (10 animaux). Pour chaque gène, nous envisageons un maximum de trois séries par gène (30 animaux par gène, soit un total de 60 animaux). Cependant, étant donné des outils moléculaires utilisés, nous espérons qu'une série par gène sera suffisante (total de 20 animaux) pour générer les fondateurs des deux lignées. Des embryons traités surnuméraires seront cultivés *in vitro* jusqu'au stade de blastocyste afin d'évaluer par PCR le taux de mutations induites. Le taux de mutation et le taux de gestation permettront de décider si une autre série doit être lancée ou non (Réduire). Les chirurgies (transfert d'embryons) seront réalisées sous anesthésie gazeuse accompagnée d'une anesthésie locale et d'un traitement antibiotique et analgésique préventifs. Si des signes de douleurs apparaissent par la suite (Point limite : perte

d'appétit, isolement, voussure,...), la femelle sera euthanasiée et autopsiées pour identifier la cause du problème et l'état des fœtus. Les porcelets seront génotypés à la naissance grâce au fragment d'oreille prélevé lors de la pose des boucles auriculaires réglementaires (Raffiner). Les fondateurs seront croisés et élevés afin d'obtenir une lignée mutée homozygote pour chaque gène. Les animaux seront hébergés dans des loges sur caillebotis équipés de chaînes et balles (jouets, Raffiner) avec accès à l'eau ad libitum et nourriture matin et soir.

12241 Un anticorps est une glycoprotéine complexe produite par le système immunitaire en réponse à une stimulation par un composant habituellement étranger, aussi appelé antigène. Les anticorps sont capables de se fixer spécifiquement aux antigènes pour les neutraliser, mais aussi de recruter des effecteurs du système immunitaire, tels que les macrophages, les cellules NK ou encore le système du complément afin d'éliminer toutes structures biologiques qui expriment ces antigènes.

En marge de leur application thérapeutique, les anticorps sont à la base de l'immunohistochimie, une technique facilement accessible qui reste une étape essentielle dans la démarche diagnostique. Elle permet la révélation de protéines spécifiques et leur localisation cellulaire dans une coupe de tissu préalablement fixée au formol ou incluse en paraffine. L'intérêt est alors multiple puisque les anticorps permettent, par exemple, l'identification et la classification de tumeurs indifférenciées, l'orientation vers une étiologie de la tumeur, la mise en évidence d'agents infectieux ou encore la quantification de sécrétions hormonales.

Notre travail, guidé par la règle des 3R, s'oriente vers la préparation d'anticorps dirigés contre des peptides de synthèse hautement purs à fort potentiel thérapeutique, issus en particulier de venins d'hyménoptères, pour deux applications principales, 1/ mettre en œuvre des études immunohistochimiques de localisation cellulaire de peptides d'intérêt sur des coupes de tissus biologiques et 2/ mettre en place un dosage radioimmunologique de ces peptides.

Les lagomorphes, comme le lapin, sont l'espèce de choix pour la production d'anticorps, offrant un compromis idéal entre le volume sanguin et la facilité de manipulation et d'hébergement. De plus, la taille des oreilles et l'absence de pigmentation facilitent les prélèvements et les injections. Les systèmes cellulaires alternatifs sont dans ce cadre plus largement dédiés aux productions industrielles d'anticorps qu'à des fins de recherche. Le nombre maximal d'animaux est estimé à 3 lapins par antigène, à raison de 3 campagnes d'immunisation par an (total sur 3 ans : 27 lapins). Le fait d'immuniser 3 lapins avec le même antigène permet d'assurer la production d'au moins un antisérum avec un titre important. Chaque lapin se verra appliquer des mesures anesthésiques et analgésiques adaptées et sera suivi individuellement pendant et après le protocole. Une grille décisionnelle d'arrêt de protocole sera établie afin de limiter une éventuelle souffrance des animaux suite à leur examen clinique. A terme, cette étude nous permettra de disposer d'anticorps polyclonaux hautement spécifiques pour les antigènes sélectionnés à même d'initier nos protocoles d'immunohistochimie et de dosage radioimmunologique.

12242 La maladie de Crohn et la rectocolique hémorragique sont des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) qui peuvent conduire à l'ulcération et la fibrose de l'intestin. Avec le temps, les MICI peuvent entraîner la survenue du cancer colorectal, et elles n'ont à ce jour aucun traitement curatif. En effet, les traitements proposés jusqu'à présent, visent surtout à améliorer le bien-être du patient mais parfois ceux-ci ne répondent plus aux traitements à plus ou moins long terme. Il est donc important de développer de nouveaux traitements moins toxiques et qui peuvent traiter à la fois la phase aiguë et la phase chronique de la maladie.

Les MICI sont causées par une dérégulation du système immunitaire envers le microbiote intestinal et implique le recrutement de macrophages pro-inflammatoires, de neutrophiles et de lymphocytes et la sécrétion de nombreuses cytokines. L'inflammation peut être due à de nombreux facteurs environnementaux parmi lesquels le stress, via la sécrétion de catécholamines et l'activation des récepteurs α -adrénergique et β 2-adrénergique. Un troisième récepteur, le récepteur β 3-adrénergique (β 3-AR) pourrait également être une cible de ces catécholamines.

Des travaux menés dans des modèles *in vitro* par notre laboratoire, ont permis de montrer que le β 3-AR est exprimé et fonctionnel dans les macrophages. Sa stimulation conduit à une réponse anti-

inflammatoire et antioxydante. Nous souhaitons donc maintenant confirmer ces propriétés in vivo, grâce à un modèle d'inflammation intestinale induite (souris BALB/c traitées au TNBS en intrarectal). Pour résoudre les problèmes de solubilité des agonistes du b3-AR et pour cibler spécifiquement les cellules immunitaires, nous souhaitons étudier l'impact, sur la réponse anti-inflammatoire, d'une formulation dans laquelle les agonistes du b3-AR seraient vectorisés dans des lipoprotéines (HDL). Nous mettrons en place des mesures pour appliquer la règle des 3R pour ces protocoles expérimentaux

Remplacement : les travaux in vitro ont déjà démontré l'effet des agonistes du b3-AR sur la réponse anti-inflammatoire. Nous voulons donc par l'intermédiaire des différents modèles in vivo déterminer si les agonistes du récepteur b3-adrénergique peuvent avoir un effet bénéfique sur la réduction de l'inflammation intestinale.

Raffinement : le bien-être des animaux sera évalué quotidiennement, une supplémentation en nourriture gélatinée sera apportée si besoin, les souris seront hébergées en groupe et le milieu aura un enrichissement structurel. L'inflammation intestinale aiguë induite par le TNBS se manifeste par plusieurs symptômes, notamment un saignement rectal et une perte de poids. Toutes les souris seront donc surveillées attentivement pendant la durée de l'étude, et l'utilisation d'une grille de score clinique nous permettra d'avoir une vision globale de leur état de santé, et de prendre les mesures nécessaires pour atténuer toute souffrance ou angoisse. Si les points limites que nous avons établis sont atteints, les souris seront mises à mort selon l'une des méthodes acceptées par la législation.

Réduction : Nous évaluons à 245 le nombre total d'animaux nécessaire à l'étude, ce qui correspond au nombre minimal permettant d'obtenir une étude statistique valable avec les tests statistiques que nous avons adaptés à cette étude.

Les résultats obtenus pourraient contribuer au développement d'une approche thérapeutique visant à améliorer la prise en charge des patients atteints par les MICI.

12243 Lorsqu'on contracte une infection, l'organisme se défend en produisant de l'inflammation. Dans les formes les moins sévères d'infection, cela explique la fièvre, la fatigue et la plupart des symptômes que l'on ressent. Cette réponse inflammatoire de l'organisme s'appelle le sepsis. Quand l'infection est extrêmement sévère, le sepsis va finir par "agresser" les organes de la personne infectée. Les formes les plus sévères de sepsis vont engendrer une ou plusieurs dysfonctions d'organe et évoluer vers un "syndrome de défaillance multiviscérale" (tous les organes se mettent à mal fonctionner) qui conduit au décès. Parmi les dysfonctions d'organes liées au sepsis, la cardiomyopathie induite par le sepsis (CMIS) est l'une des plus grave. Elle est fréquente (40 à 60% des cas d'infection grave) et grave (mortalité 40%).

Les mécanismes impliqués dans la CMIS doivent encore être exploré. On sait déjà que les mécanismes impliqués reposent sur les molécules de l'inflammation et les échanges d'ions (comme le calcium) dans les cellules cardiaques. Des études ont déjà montré qu'une action thérapeutique sur les échanges de calcium dans les cellules cardiaques pouvait protéger le coeur, par exemple en cas d'infarctus du myocarde. Il est probable qu'une même action thérapeutique puisse donc protéger le coeur en cas d'infection très sévère.

L'objectif de ce travail est de montrer que la régulation des échanges de calcium au niveau des cellules du coeur peut avoir une action protectrice en cas d'infection sévère. Pour étudier cette nouvelle voie thérapeutique, il faut un modèle qui s'approche au plus près des patients de réanimation. Nous allons donc utiliser un modèle de rat infecté par une injection d'un fragment de bactérie (LPS d'*Escherichia coli*) sous anesthésie générale et ventilation mécanique, chez qui on surveillera la fréquence cardiaque, la tension artérielle, l'échographie cardiaque. On réalisera un dosage des molécules de l'inflammation et on étudiera les échanges de calcium dans les cellules cardiaques. Notre étude sera menée sur des rats de 8-10 semaines, selon les recommandations institutionnelles en vigueur. Un total de 60 animaux sera utilisé sur 5 ans pour ce projet. Un groupe de 15 rats recevra différentes doses de LPS pour déterminer l'intensité du sepsis qui permettra d'observer une CMIS. Le reste des animaux (45) sera utilisé pour étudier les échanges calciques et l'effet d'une régulation de ces échanges pour protéger le coeur.

Les animaux seront hébergés en portoir ventilé, dans le respect de la réglementation concernant les effectifs par cage, et des lanières de résineux tendre seront utilisés pour l'enrichissement. Des points limites seront établis dans chaque étude afin d'éviter ou limiter toute souffrance des animaux. Nous respecterons le principe des 3 R. Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux, nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous réduirons le nombre d'animaux via une approche rationnelle et organisée sur le plan des protocoles (acquisition d'un maximum de données pour chaque animal (pression artérielle, fréquence cardiaque, analyse biologique, histologie) afin d'apparier les mesures, de diminuer les groupes et d'optimiser les interprétations). Nous utiliserons de façon optimale les tissus des animaux sacrifiés (multiplication des analyses, travail sur des échantillons de petite taille). Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux, et pour apprécier au mieux les points limites. Des traitements antalgiques sont prévus pour réduire la souffrance animale (totalité de la procédure réalisée sous anesthésie générale).

12244 Le choc septique peut être classé parmi les états de choc de type distributif. La physiopathologie du choc septique, qui résulte de l'invasion de l'organisme par des agents infectieux (bactéries à Gram négatif et à Gram positif, champignons, virus), est complexe. Le sepsis touche jusqu'à 1% de la population tous les ans avec un taux de mortalité de 25 à 40% ce qui en fait la 10ème cause de mortalité dans les pays développés et la 1ère cause de mortalité dans les unités de soins intensifs. Malgré une physiopathologie de mieux en mieux connue et une prise en charge grandement améliorée au cours des dernières années, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement spécifique, les patients ne recevant que le support à leurs fonctions vitales et des antibiotiques. Il est donc nécessaire d'améliorer notre connaissance de ce syndrome afin de permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces.

TREM-1 est un immuno-récepteur exprimé par les cellules de l'immunité innée, les plaquettes et les cellules endothéliales dans des situations d'agression tissulaire aiguë. Il fait partie des 10 voies les plus surexprimées lors de la tempête génomique observée chez les patients atteints de choc septique. L'activation de la voie de TREM-1 conduit à une réponse inflammatoire excessive impliquée dans la transition du sepsis au choc septique.

Nous avons développé un immunomodulateur (inhibiteur de TREM-1) qui est un peptide synthétique visant à contrôler la boucle amplificatrice de la réponse inflammatoire en inhibant le récepteur TREM-1. Plusieurs modèles précliniques de choc septique permettent de documenter l'efficacité thérapeutique de cet immunomodulateur dans différentes espèces. Ces études ont montré une réponse inflammatoire équilibrée, une amélioration des paramètres hémodynamiques/vasculaires et une meilleure survie.

De récentes études issues du laboratoire sur le mécanisme d'action nécessaire à l'activation de TREM-1 nous ont incité à développer un nouvel inhibiteur pharmacologique de l'activation de TREM-1. L'objectif de cette étude vise à évaluer l'efficacité de différentes doses de cet inhibiteur sur la survie par l'utilisation de deux modèles expérimentaux de choc septique à savoir le modèle par injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide (LPS) et un modèle d'infection polymicrobien (péritonite suite à la Ligature et Ponction Cæcale, CLP) afin de déterminer la dose efficace qui sera utilisée pour la suite de l'étude. Après avoir déterminé la dose efficace, plusieurs approches seront utilisées afin d'étudier les profils inflammatoires leucocytaires, les dysfonctions d'organes, les marqueurs inflammatoires et endothéliales. Le nombre total de souris utilisées dans ce projet est estimé à 390 souris adultes. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

Remplacement : Il n'existe aucune approche in vitro qui pourrait nous permettre d'étudier le rôle de TREM-1 dans le développement d'une pathologie infectieuse comme le choc septique. Une étude chez un organisme vivant est indispensable pour mettre en évidence l'effet de l'inhibition de TREM-1 sur l'ensemble des paramètres (leucocytes, réponse inflammatoire, etc...) contribuant au développement du sepsis et évaluer réellement le potentiel thérapeutique du peptide.

Réduction : l'étude sera réalisée avec un nombre total de 390 animaux afin de constituer les différents groupes d'analyses. Chaque groupe comportera un nombre d'animaux qui dépend de la procédure à réaliser : un nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, au vu des analyses qui seront conduites à partir de ces animaux. De plus, l'utilisation d'animaux est rendue nécessaire par l'absence de modèle in vitro ou de possibilité de modélisation in silico. Nous avons veillé à réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaire tout en garantissant une puissance statistique suffisante.

Raffinement : Dès leur réception, les animaux auront une période d'acclimatation d'une semaine pour s'adapter à leur nouvel environnement. Ils seront hébergés dans une animalerie dotée de tous les paramètres nécessaires (température, hygrométrie, filtration de l'air, ...) à leur bien-être. Les animaux seront hébergés en portoir avec des cages ventilées et filtrées, à 5 souris par cage, dans des cages de 500 cm². Les cages seront enrichies à la base de tunnel de polycarbonate et/ou buchettes en peuplier. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. Pour le bien-être des souris, celles-ci resteront en groupe dans un milieu enrichi et seront régulièrement

surveillées. Si un animal montre des signes de mal être, les dispositions adéquates à la situation seront prises comme la prise d'analgésique en cas de douleur. Nous mettons également l'accent sur les méthodes utilisées (injection intrapéritonéale de LPS, anesthésie générale, soins post-opératoires, etc..) permet ainsi un raffinement de la méthodologie. Par ailleurs, une procédure d'estimation (un score sera attribué pour chaque paramètre) et suppression de la souffrance sera mise en place. Le point limite sera fixé à 20% de perte du poids corporel avec identification des signes de mal-être définis au préalable. En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des prélèvements sanguins et d'organes seront effectués pour permettre de réaliser nos analyses.

12245 Le changement global actuel a un effet significatif sur la persistance des organismes puisque l'extinction de populations en relation avec le changement climatique, la fragmentation du paysage, les invasions biologiques ou la pollution a été observée dans de nombreux taxa. L'action conjointe de ces différents processus du changement global peut en plus avoir un effet catastrophique sur le maintien de la biodiversité, effet synergétiques rarement étudiés. La compréhension des mécanismes de réponses des espèces à ces perturbations est donc cruciale pour pouvoir prédire le devenir de certaines espèces et mettre en place des plans de conservation efficaces. Pour étudier l'effet croisé de ces facteurs, nous avons développé depuis trente ans maintenant des études de suivi longitudinales de populations de lézard vivipare (*Zootoca vivipara*) et depuis 15 ans des expériences sur cette même espèce en condition semi-contrôlées. Nos premières études ont clairement indiqué que les réponses individuelles étaient au cœur des réponses au changement climatique. Par exemple, la prise en compte des processus individuels améliorent considérablement la capacité des modèles à expliquer les extinctions passées des populations.

Pour étudier, la réponse individuelle de cette espèce au changement global, nous devons suivre chaque année le devenir des individus des populations naturelles et expérimentales de lézards au cours du temps. Pour se faire, la technique employée est le marquage par amputation de phalange. Cette procédure est la seule procédure de marquage pour les petites espèces de lézards disponible actuellement car (1) les caractéristiques externes (coloration, dessins, taille, écailles) ne permettent pas de distinguer les individus à la naissance, (2) les transpondeurs sont trop volumineux et la cautérisation d'écaille impossible pour un nouveau-né (masse <200 mg, taille < 20 mm) et les transpondeurs affectent significativement les performances des adultes, (3) le typage moléculaire est difficile à appliquer en routine car il nécessite le prélèvement d'un tissu à chaque capture, ce qui ajoute également un stress supplémentaire, et (4) le tatouage ou les autres méthodes de marquage par colorant ou cautérisation d'écailles sont inefficaces sur le long terme chez des lézards qui mue 1 fois par mois et à peau épaisse et sombre. Il est d'ailleurs à noter que cette espèce perd naturellement ces doigts en condition naturelle. Des études précédentes ont montré que les paramètres tels que comportement, vitesse, endurance, fécondité et survie n'était en rien altéré par cette méthode de marquage. Enfin, si la capture d'un individu entraîne nécessairement un stress

(stress dont la signature hormonale disparaît quelques heures après la capture), aucune signature comportementale de stress n'est visible un jour après le marquage des individus, ainsi qu'aucun signe d'inflammation ou de dégénérescence tissulaire n'est constatée sur le long terme.

Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle non vivant (remplacement) car cela engendrerait une erreur de prédiction du devenir de cette espèce et des espèces ectothermes en général. L'aspect non linéaire (c.à.d. effet de seuil) des réponses au changement climatique ne permet pas non plus d'utiliser les données précédemment acquise pour projeter les réponses futures. Une connaissance beaucoup plus approfondie de la réponse de populations aux aspects thermiques, hydriques et sociales de leur environnement est absolument nécessaire, connaissance qui est loin d'être encore acquise. A cette fin, nous utilisons à la fois des expériences de réchauffement climatique dans lesquels les individus sont marqués individuellement à leur naissance (soit 400 juvéniles par an) et un suivi de 24 populations naturelles du Massif Central. Sur ces populations, 2 populations seulement sont suivies avec la plus grande exhaustivité au marquage individuel (soit 900 nouveaux individus par an) qui permet de contrôler en moyenne 80 à 90% de la population annuellement. Pour les 22 autres populations, les adultes sont suivis sans marquage. Le nombre d'individus étudiés en populations expérimentales et naturelles a été choisi soit pour mimer les densités présentes en milieu naturel soit pour veiller à une certaine représentation statistique pour les populations naturelles. Le nombre de populations a été déterminé pour estimer correctement à la fois la variation existante entre les individus et celle existante entre les populations afin de pouvoir tirer des conclusions robustes de nos observations, tout en minimisant le nombre d'individus manipulés. Si un accroissement des individus capturés et marqués n'est maintenant plus nécessaire, leur réduction n'est pas envisageable sans mettre en péril l'ensemble de cette recherche. Nous évitons d'ailleurs le marquage individuel lorsque celui n'est pas absolument indispensable, ce qui est le cas dominant (réduction, 1300 individus par an, 6500 sur 5 ans). Afin de minimiser l'impact sur la souffrance, le bien-être et la survie des individus marqués (raffinement), nous prenons plusieurs précautions : le marquage rapide (< 1 min), un abaissement de la température avant marquage pour limiter le stress de contention, un marquage 3h après la naissance pour la plus grande part des individus, et une stratégie de réduction du nombre de phalanges distales amputées (4.5 en moyenne) permettant un nombre maximal de codes uniques (~5000). En comparaison à d'autres méthodes, l'efficacité de ce marquage est de loin la plus importante à la fois en termes de reconnaissance individuelle et en termes de minimisation des effets induits sur la santé des individus. Nous poursuivons néanmoins notre recherche de méthodes alternatives.

12246 L'utilisation de sons simples lors d'opérations dentaires a montré une réduction significative de la douleur pour 90% des patients écoutant de la musique durant l'opération. Des études ultérieures ont montré que les sons émis à des fréquences connues pour leurs effets sur les fonctions cognitives (ondes alpha) ont également des propriétés antalgiques.

Peu de travaux sont disponibles chez les animaux bien que de tels travaux soient nécessaires pour établir les bases des mécanismes anti nociceptifs chez l'Homme, et explorer des combinaisons de stimulations sensorielles dans le but de provoquer un soulagement de la douleur qui se maintienne au cours du temps.

Le projet actuel se met en place dans le cadre d'une collaboration avec une société privée dont l'objectif est de développer des protocoles de stimulations sensorielles, sonores en particulier, pour diminuer la douleur chez des patients humains. L'objet de notre présente étude est de valider un dispositif de stimulations sonores chez la souris. Le modèle choisi est la souris de type C57Bl/6J qui exprime une douleur inflammatoire modérée sur 4 jours, obtenue par injection intra-plantaire d'une solution pro-inflammatoire (adjuvant de Freund). Il s'agit d'un modèle d'études couramment utilisé au sein de notre équipe et dans le monde. Nous soumettrons les souris à des sons obtenus par des haut-parleurs placés dans les cages. Nous réaliserons ces stimulations sonores de manière continue ou répétée afin d'évaluer les meilleurs protocoles. A l'aide de tests sensoriels classiques, nous chercherons ensuite à déterminer si les sons modifient les seuils de réponse à des stimulations cutanées périphériques. L'objectif est de déterminer les conditions de stimulation sonore pour

lesquelles les souris montrent une augmentation des seuils et donc une diminution du réflexe d'évitement lié aux stimulations cutanées périphériques.

La validation de ce dispositif de stimulations sonores chez la souris permettra ensuite à notre équipe d'identifier les mécanismes neurobiologiques sous-jacents. Ce travail servira de base à la mise au point de protocoles plus efficaces associant des combinaisons de stimulations sensorielles visant à procurer un soulagement persistant contre la douleur.

Ce projet respecte la règle des 3R. Pour le R de Raffiner, tous les protocoles sont optimisés pour soulager le stress et la douleur des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement par l'expérimentateur avec une surveillance renforcée après l'injection intra-plantaire de l'adjuvant de Freund avec la mise en place d'une réhydratation, un réchauffement, des traitements vétérinaires si besoin. Des points limites sont définis pour éviter la souffrance des animaux.

Pour le R de Remplacer, le recours au modèle animal est indispensable car ce projet demande une évaluation comportementale et aucun modèle in vitro ne peut reproduire les conditions de la pathologie étudiée.

La réduction du nombre d'animaux (R de réduire) est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique qui tient compte de l'hétérogénéité interindividuelle. Le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas ainsi 10 animaux par groupe. La réalisation de ce projet dans son ensemble nécessite au total l'utilisation de 120 souris de type C57Bl/6J.

12247 Nos fonctions sensorielles, motrices et les différentes fonctions automatiques de l'organisme (digestion respiration, circulation artérielle et veineuse, pression artérielle, sudation...) reposent sur la communication entre le cerveau et la moelle épinière. Suite à une atteinte traumatique ou pathologique de la moelle épinière, ces fonctions sont durablement affectées en dessous de la lésion. En plus des effets sur les systèmes sensoriels et moteurs bien connus et identifiés (paralysie, insensibilité), les sujets présentent également d'importantes détériorations de l'activité du système nerveux autonome. Le système nerveux autonome est divisé en deux composantes aux fonctions antagonistes, le système nerveux sympathique et le système nerveux parasympathique. D'un point de vue clinique, on observe de nombreux symptômes cardiovasculaires qui contribuent à 40 % des décès chez les patients blessés médullaires. La pression artérielle est régulée par des neurones appelés neurones sympathiques situés dans la moelle épinière et dont le niveau d'activité au repos constitue un des paramètres centraux du contrôle à long terme de la pression sanguine. Classiquement, on considérait que la régulation de la pression artérielle était sous le contrôle exclusif de voies descendantes en provenance du tronc cérébral qui régulaient l'activité de ces neurones sympathiques. Nous avons récemment montré que l'activité des neurones sympathiques pouvait aussi être contrôlée directement à l'étage spinal par un réseau de neurones rythmiquement actifs, activé par le système cholinergique.

Dans le présent projet, nous postulons que l'existence d'un tel couplage intraspinal et la possibilité d'activer pharmacologiquement conjointement les systèmes sympathique et somatique soulèvent des perspectives de traitements afin de réduire la gravité des symptômes vasculaires chez les patients atteints de lésions spinales. Ce projet a pour but d'identifier les neurones constituant ce réseau neuronal qui dans la moelle épinière assure le couplage entre système moteur et autonome. À cette fin, nous réaliserons dans le muscle du mollet, des injections de souches atténuées de virus de la rage et du virus de la pseudo-rage (ou maladie d'Aujeszky) génétiquement modifié afin d'incorporer des protéines fluorescentes. Ces virus ont la propriété de franchir les synapses établies entre les neurones et ainsi de réaliser un marquage rétrograde transynaptique des voies neuronales. Les neurones marqués par les deux virus seront les éléments communs au système moteur et au système nerveux sympathique.

Le choix de la mise en place du projet est le fruit d'un travail préparatoire qui a consisté à réunir l'ensemble des moyens matériels (chirurgicaux, traceurs viraux) et l'expertise nécessaire à sa réalisation. Au regard de l'absence d'outils non invasifs permettant chez l'homme, l'exploration des phénomènes physiologiques que nous souhaitons étudier, et du manque de connaissances

nécessaires à l'établissement d'outils de modélisation des réseaux de neurones sympathiques, notre projet ne peut s'abstenir de l'utilisation du modèle animal.

Cette étude sera réalisée sur des rats juvéniles. En se basant sur l'analyse de la littérature utilisant la même technique, nous utiliserons trois groupes constitués de 20 animaux (groupe 1 : injection du virus de la pseudo-rage (ou maladie d'Aujeszky) sans lésion ; groupe 2 : injection du virus de la rage modifié sur des animaux sans lésions ; groupe 3 : injection du virus de la rage modifié + lésion et injection du virus de la pseudo-rage ; Total = 60 animaux). Il faut ajouter les animaux qui seront pris en compte dans les ajustements expérimentaux et échecs de procédures (nombre anticipé à 40 ce qui mènera à un nombre total de 100 animaux), chiffres qui prennent en compte les contraintes statistiques et la nature des expériences/analyses réalisées. Chaque expérience sera lancée dans un premier temps sur un nombre restreint d'animaux afin d'évaluer la pertinence de poursuivre la série expérimentale. Par ailleurs, dans le souci de réduire au maximum le nombre d'animaux dans les projets à venir, nous utiliserons les moelles épinières pour les différents marquages et nous enrichirons une banque de tissu à partir des animaux utilisés dans ce projet.

Les expérimentations nécessitant l'utilisation de vecteurs viraux seront réalisées dans un local confiné de niveau 2 (A2). Les animaux seront conservés dans ce local confiné le temps indispensable à la multiplication et la diffusion des virus dans le système nerveux central des animaux. Nous sommes particulièrement vigilants à ce qui a trait au bien-être animal et la prise en charge de la douleur. Des points limites ainsi que des procédures adaptées ont été établis (notamment prophylactiques et analgésiques) qui permettront de garantir la pertinence des résultats et le bien-être des animaux. Les chercheurs participant au projet ont une solide expérience dans la manipulation de rongeurs et l'ensemble des compétences requises à sa réalisation (notamment chirurgicales). À ce titre, il convient de préciser que le projet est bâti en accord avec les recommandations et conseils de la vétérinaire de l'établissement. Cette dernière sera sollicitée chaque fois que nécessaire par les coordinateurs du projet ce qui en outre lui permettant de suivre, bien que de façon externe, le déroulement du projet et de proposer des procédures de raffinement bénéfiques à tous les égards.

12248 Les amphibiens sont des modèles expérimentaux adaptés pour élucider les mécanismes à la base du développement animal.

Les xenopes sont des crapauds qui pondent des œufs en grande quantité et de grande taille et la fécondation et le développement sont externes ce qui facilite les expérimentations.

L'ovocyte, ovule de xenopes est une cellule qui peut être cultivée in vitro pendant au moins 10 jours. C'est un véritable tube à essai qui permet l'expression de très nombreuses protéines membranaires de toutes origines.

Il est ainsi possible d'étudier avec une précision moléculaire les interactions ligands récepteurs, les propriétés de canaux hydriques ou ioniques, les transporteurs membranaires.

En France, près de 70 équipes de recherches travaillent sur l'espèce xenopes. C'est une espèce modèle de vertébré aquatique à part entière dont l'utilisation nécessite d'être formé aux bonnes pratiques, c'est pourquoi une formation aquatique niveau concepteur et opérateur agréée a été développée.

Au cours de cette formation, la technique de fécondation in vitro est montrée et le développement des œufs est suivi car ce type d'expérimentation est à la base de nombreuses études de biologie du développement sur ce modèle.

Ceci nécessite la mise en ponte des femelles par stimulation hormonale (injection en sous cutané) afin de récolter des ovocytes qui sont fécondés par un broyat testiculaire (prélèvement testiculaire post mortem chez le mâle).

Les œufs fécondés obtenus sont ensuite suivis sur la semaine de formation pour l'observation des différents stades de développement.

A l'année 12 femelles sont nécessaires pour les 3 sessions de formation soit un total de 60 animaux pour 5 ans. Les animaux sont utilisés pour former les stagiaires à la manipulation, au sexage, à la mise à la reproduction, à l'anesthésie et à l'anatomie.

Dans ce cadre nous veillons au respect des 3R: le nombre d'animaux mis en expérimentation (4 par session de formation) est réduit au minimum permettant l'obtention d'œufs. De plus à l'issue de la fécondation, les femelles sont mises à mort et utilisées dans le cadre du tp anatomie comparée des espèces aquatiques, ce qui évite l'utilisation d'animaux supplémentaires. Les conditions ont été raffinées en stabulant les animaux dans des aquariums dont la surface respecte le bien-être animal, et en y plaçant des tubes leur permettant de s'y cacher à loisir sont placés dans les aquariums. La mise en ponte et le massage des femelles permettant la production d'œufs sont considérés sans douleur en prenant les précautions de préhension pour ne pas altérer la peau et de réaliser un geste limiter dans le temps.

Un état de stress est tout de suite visible par l'émission de venin par les glandes épithéliales si qui entraîne l'arrêt immédiat et la mise en observation de l'animal (inférieur à 1% des cas)

Une observation régulière des animaux est pratiquée plusieurs fois par jour. En cas d'évaluation de signes régressifs connus pour cette espèce (perte de poids, immobilité, nécrose ou mauvais état de la peau) l'animal serait mis à mort par une méthode réglementaire

Cependant il n'est pas possible de remplacer les animaux puisqu'au cours des séances de travaux pratiques l'obtention d'œufs fraîchement fécondés et viables sont nécessaires pour décrire les bonnes pratiques zootechniques.

12249 Dans les systèmes d'élevage laitiers actuels, les veaux mâles et femelles (velles) sont généralement séparés de leur mère dès les premières heures après la naissance. Après 1 à 2 semaines où elles sont élevées individuellement pour un meilleur suivi sanitaire et un contrôle de l'ingestion, les velles sont élevées en groupe et reçoivent une alimentation lactée à base de lait en poudre ou de lait entier (le plus souvent non commercialisable). Les veaux mâles sont vendus entre 14 et 21 jours pour des ateliers d'engraissement. La séparation très précoce des jeunes veaux de leur mère interroge toutefois de plus en plus la société au regard du respect du bien-être des animaux. En agriculture biologique, des pratiques plus respectueuses du bien-être des veaux sont inscrites dans le cahier des charges, et certains éleveurs maintiennent les veaux mâles et/ou femelles avec leur mère (de 1 semaine à 6 mois). Les conséquences d'une telle pratique ont surtout été étudiées sur le bien-être du couple mère-veau. En 2007 et 2009, les performances des vaches (production, reproduction, santé de la mamelle et qualité du lait) et des veaux (croissance, santé) avaient été étudiées, mais dans le contexte particulier de la monotraite, où des chutes importantes de production laitière sont observées.

L'objectif du travail proposé est d'affiner la mise au point d'un système d'élevage qui permette i. de maintenir le contact mère-veau, ii. d'assurer une bonne croissance et une bonne santé des veaux et iii. de produire suffisamment de lait en salle de traite. Ce protocole expérimental s'appuie notamment sur les pratiques majoritairement mises en place par les éleveurs enquêtés en 2018. Nous comparerons une conduite classique d'élevage des velles au distributeur automatique de lait (DAL) (appliquée également à quelques veaux mâles afin de disposer de 8 veaux par lot, permettant une interprétation statistique) à une pratique d'allaitement naturel sous la mère, soit jusqu'au sevrage, soit pendant 3 semaines avant le passage au DAL (tétée possible durant ± 6 heures, entre les traites du matin et du soir).

Trois lots de 14 vaches (= 42) et leurs veaux (= 42) seront suivis du vêlage jusqu'à 3 semaines après le sevrage des veaux femelles (= 13 semaines, sauf pour les veaux mâles vendus classiquement après 3 semaines).

L'objectif du travail étant la mise au point d'un système d'élevage qui permette de maintenir le contact mère-veau, l'utilisation de couples veau/vache est indispensable.

12250 La mucoviscidose (CF) est une pathologie génétique mortelle pour laquelle aucun traitement n'est disponible à ce jour. Cependant depuis quelques années, de nouvelles molécules permettant de

corriger la cause de la maladie ont été découvertes. Parmi celles-ci, une combinaison de deux médicaments a montré son efficacité partielle. Au laboratoire nous disposons d'une nouvelle famille de molécules dont l'efficacité est similaire voire supérieure à celle de la combinaison couramment employée lors des différents tests réalisés sur des cellules atteintes de mucoviscidose. Néanmoins, leur efficacité clinique reste à démontrer. Dans le cadre de ce projet, nous proposons de valider l'efficacité de ces molécules, dans un modèle préclinique de souris atteintes de mucoviscidose bien connu et n'entraînant pas prévisiblement de souffrance particulière aux animaux. Pour ce faire, après avoir sélectionné la molécule la plus efficace chez ces animaux sur des cultures de cellules afin de limiter le nombre d'animaux impliqués, au maximum, 108 souris (78 atteintes de mucoviscidose et 30 non atteintes) seront étudiées afin de mettre en évidence l'efficacité de cette molécule dans la correction des troubles liés à la mucoviscidose au niveau de l'axe respiratoire. Cette étude est planifiée sur 5 ans. Au maximum 108 souris pourront être traitées en une année. L'étude sera réalisée de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux employés en arrêtant l'expérimentation dès que des résultats statistiquement significatifs seront obtenus et en nous assurant de la faisabilité de l'obtention de ces résultats à mi-parcours. Toutes les précautions seront prises afin de réduire et raffiner ces expérimentations. Ainsi, toutes les procédures potentiellement stressantes ou créatrices de douleurs seront réalisées sous anesthésie général. Par ailleurs, des visites régulières bi-quotidiennes le jour du traitement puis quotidiennes par la suite seront mises en place de façon à réaliser un examen clinique permettant de détecter au plus tôt tout éventuel signe de souffrance et le traiter au besoin. Des points critiques sont établis afin de permettre une prise en charge des éventuels souffrances ressenties par les animaux qui seront hébergés conformément aux recommandations en vigueur (5 individus par cages) Il pourrait découler de ces recherches une meilleure prise en charge thérapeutique des patients atteints de mucoviscidose ainsi que la découverte de nouvelles modalités d'action permettant de corriger les altérations physiologiques liées à la mucoviscidose.

12251 La baleine à bosse fût largement chassée au cours de la première moitié du XXème siècle, notamment dans l'océan Indien. Après être passée au bord de l'extinction, l'espèce voit sa population globale se redresser grâce aux différentes mesures de protection mises en place sous l'égide de la Commission Baleinière Internationale à partir de 1979. L'état de conservation de la baleine à bosse est aujourd'hui considéré comme « Préoccupation Mineure » à l'échelle mondiale, mais reste « Vulnérable » à la Réunion (Liste Rouge nationale des espèces menacées d'extinction, Comité français de l'UICN, 2010).

A la Réunion, cette espèce fait l'objet d'un suivi scientifique depuis 2004. Celle-ci est présente dans les eaux réunionnaises pendant l'hiver austral afin d'y accomplir deux « phases clés » de son cycle biologique : la reproduction et la mise bas.

Les connaissances sur les parcours migratoires des baleines à bosse, entre leurs sites de reproduction et leur site de nourrissage, restent extrêmement faibles. L'acquisition de ces connaissances est une étape cruciale visant au renforcement et/ou à la mise en place de mesures de protection et à la gestion de la population de baleines à bosse du Sud-Ouest de l'océan Indien.

Le programme pour objectif de définir les routes migratoires des baleines à bosse de la Réunion. La première phase du programme a permis d'équiper de balises Argos 15 individus, au milieu de la saison de présence des baleines à bosse dans les eaux réunionnaises, et de suivre leurs mouvements migratoires au sein de l'océan Indien occidental. Cette étude a notamment permis :

- d'identifier un couloir migratoire entre la Réunion et le Nord-Est de Madagascar mettant en évidence l'important rôle connexe que jouent ces deux îles au niveau du cycle biologique des animaux,

- de recenser de nouveaux sites de reproduction, jamais prospectés auparavant, tels que le mont sous-marin La Pérouse et le plateau des Mascareignes.

La durée de vie des balises Argos n'a néanmoins pas permis de suivre les individus lors de leur migration retour vers les sites de nourrissage antarctiques.

La 2ème phase du programme se propose d'équiper de balises Argos 15 baleines à bosse adultes à la Réunion, en parallèle de leur biopsie, en fin de saison « baleine », soit fin septembre 2019, afin d'identifier les mouvements migratoires entre la zone de reproduction que constitue la Réunion et les zones de nourrissage antarctiques ou sub-antarctiques.

Ces données permettront notamment d'obtenir des informations précises sur les trajets et le temps de migration, le degré d'utilisation des sites potentiellement importants pour la reproduction et de mieux définir les couloirs migratoires ainsi que les zones de nourrissage. Ces données viendront compléter celles précédemment acquises lors de la phase I, ce qui nous permettra de disposer d'une vision globale des mouvements des baleines à bosse sur l'ensemble de leur cycle migratoire.

Les balises seront déployées à distance, à l'aide d'un fusil à air comprimé, et seront implantées dans la couche de lard située à l'avant de la nageoire dorsale. En parallèle de ces équipements, un prélèvement cutané sera réalisé sur chaque individu équipé afin de permettre leur sexage ainsi que leur identification génétique et, ainsi, contribuer à l'analyse régionale du stock de baleines à bosse de l'océan Indien occidental. Equipements de balises Argos et prélèvements cutanés seront réalisés par du personnel expérimenté. La photo-identification des individus équipés permettra d'éviter d'équiper et de prélever le même individu à 2 reprises. Un suivi focal de l'individu ciblé et du groupe auquel il appartient sera réalisé dans les 15 minutes suivant les opérations (suivi à court terme). Les réactions comportementales individuelles et à l'échelle du groupe seront estimées et notées dans des fiches standardisées.

Les objectifs du projet imposent la pose de balise et le prélèvement de biopsie sur des baleines à bosse dans le but de suivre leurs trajets migratoires lors de leur présence dans les eaux réunionnaises, en vue notamment de leur conservation. Aucun autre modèle ne peut être substitué. Le protocole de déploiement est défini, au préalable, selon les standards internationaux, en respectant le principe des 3 R (Remplacement, réduction, raffinement). De plus, un soin tout particulier est donné à la fixation des points limites.

12252 Notre sujet de recherche est orienté vers l'étude de physiopathologie des maladies neuro-développementales d'origine génétique chez l'Homme, responsables notamment d'épilepsie voire de défaut des capacités intellectuelles. Nous et nos collaborateurs avons identifié de nombreux gènes impliqués dans ces maladies. L'objectif principal de notre travail est de mieux comprendre les rôles de ces gènes et de leurs protéines dans les processus développementaux du système nerveux central et ainsi d'améliorer notre compréhension des mécanismes soutenant l'apparition dans ces maladies chez l'homme. L'utilisation de modèles murins est indispensable pour étudier in vivo les conséquences sur la prolifération des progéniteurs neuronaux, la migration et la différenciation des cellules neuronales. Ce type d'approche s'impose car aucun modèle d'expérimentation in vitro ne peut mimer ou refléter toute la complexité des phénomènes ayant lieu dans le cortex en développement.

Nous analysons le rôle de nos gènes d'intérêt pendant les stades de développement embryonnaire du cerveau grâce à des approches génétiques visant à modifier l'expression ou la fonction des protéines étudiées. Pour cela, nous avons besoin de transférer de l'ADN plasmidique non pathogène par un protocole d'injection/électroporation in utero dans le système nerveux central d'embryons de souris gestante anesthésiées. En sacrifiant les animaux à différents temps de la gestation, nous pouvons étudier les conséquences cellulaires de ces modifications génétiques sur les différentes phases du développement du cerveau.

Le nombre total de souris gestantes utilisées pour ce projet est estimé à 400 femelles gestantes permettant d'obtenir suffisamment d'embryons pour les manipulations.

L'utilisation de l'expérimentation animale pour nos travaux est rendue nécessaire par la complexité de l'environnement cortical qui ne peut pas être recréé par des approches in vitro. Toutefois, nous garderons à l'esprit notre responsabilité de diminuer au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en atteignant la significativité statistique. Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés, aucune nouvelle expérience ne sera effectuée avant qu'une analyse complète des précédentes n'ait été réalisée.

Nous prendrons en compte avec la plus grande attention le bien-être de nos animaux. L'élevage et la reproduction de nos animaux se font dans un environnement contrôlé permettant une réduction du stress pour l'animal. Durant l'expérimentation les femelles gestantes sont anesthésiées par voie gazeuse (isoflurane). Nous limitons le temps de manipulation à 45 minutes sur l'animal anesthésié. Un anti-inflammatoire non-stéroïdien, la metacam, est injecté pendant l'opération par voie sous-cutanée. La metacam est également ajoutée au biberon pendant 2 jours après la chirurgie (2mg/kg dans l'eau de boisson) L'animal se réveille dans une cage chauffée à 35°C et est surveillé régulièrement. Nous vérifions que les animaux mangent et s'abreuvent normalement. Les jours suivants, les animaux sont surveillés deux fois par jour pour voir notamment si la plaie a besoin de soins et pour détecter d'éventuelles infections post-chirurgicales ou autres complications. L'objectif est de prévenir toute douleur ou détresse. En cas d'infections importantes ou de douleur manifeste, les animaux sont euthanasiés immédiatement par dislocation cervicale.

12253 Notre groupe a pour objectifs de comprendre les mécanismes moléculaires engagés dans les phénomènes de résistance aux drogues et d'identifier de nouvelles cibles pouvant faire l'objet de traitements innovants. Notre stratégie d'étude repose sur trois axes complémentaires basés sur 1) des études cellulaires in vitro, 2) l'analyse de tissus de patients, 3) la génération et l'utilisation de modèles animaux expérimentaux. Ces modèles nous permettent d'identifier de nouvelles combinaisons de traitements pour surmonter la résistance au traitement dans le cancer. Notre but ultime est de réaliser des essais cliniques pour valider les thérapies identifiées chez les patients.

Or nous savons que la découverte et le développement de nouveaux médicaments anticancéreux est un processus qui connaît un taux très élevé d'échecs (85 à 89% de taux d'attrition des médicaments anticancéreux entrant dans un test préclinique). Ce taux élevé de composés inefficaces entrant dans les tests cliniques indique un besoin de modèles précliniques plus précis et plus proche de l'homme pour prédire l'efficacité d'un médicament ou d'une combinaison de médicaments. Nous connaissons maintenant le rôle prépondérant du système immunitaire non seulement sur le développement du cancer, mais aussi sur l'efficacité des traitements, que ce soit certaines chimiothérapies capables d'induire une mort cellulaire immunologique, ou les immunothérapies, ce qui ajoute une complexité supplémentaire quant à la validité des modèles animaux pour prédire la réponse clinique.

Ainsi, les approches utilisant des modèles de xénogreffes de souris immunodéprimées (greffes de cellules cancéreuse humaines sur des souris immunodéprimées, ce qui permet d'éviter un rejet de la greffe) ainsi que des greffes syngéniques (greffes de cellules cancéreuses murines sur des souris immunocompétentes) sont nécessaires mais deviennent insuffisantes car dans les deux cas les souris manquent d'un système immunitaire humain. Par conséquent, l'humanisation des souris avec des cellules immunitaires humaines sont indispensables pour l'identification de nouveaux traitements (souris humanisées).

Nous avons identifié un nouveau traitement pour le cancer colorectal qui consiste à combiner une chimiothérapie (oxaliplatine, déjà utilisée pour le traitement des patients) avec un inhibiteur de kinase appelé VE-822. Cette association est très synergique et efficace pour l'élimination des cellules tumorales. Nous avons aussi observé que cette combinaison de produit induisait une activation du système immunitaire pour agir contre la tumeur. Ainsi nous voulons par ce projet utiliser des souris avec un système immunitaire humaine pour comprendre le rôle de l'activation du système immunitaire sur la tumeur. D'autre part, nous allons aussi utiliser en combinaison avec l'oxaliplatine et le VE-822, des anticorps activateurs du système immunitaire, pour avoir une réponse anti-tumorale encore plus forte.

Le nombre total d'animaux sera de 240 pour cette expérience. Pour « Réduire », nous utilisons le nombre minimum d'animaux qui nous permettrons de valider nos résultats en terme de statistiques.

Pour « Remplacer », nous avons réalisé avant ces expérimentations des manipulations sur des cellules cultivées sous forme de sphéroïdes, qui miment de façon plus précise l'effet des thérapies sur les organes, par rapport aux lignées cultivées en deux dimensions. La nécessité de travailler avec des souris relève ici de la nature du projet qui consiste à étudier les interrelations entre les

cellules tumorales, la réponse à la thérapie et le rôle du système immunitaire de l'hôte. Ainsi, aucun modèle in vitro ne peut remplacer cette complexité.

Enfin pour « Raffiner », nous nous attachons à diminuer les contraintes de la douleur pour les animaux utilisés c'est-à-dire que nous améliorons leur habitat en ajoutant du coton et des cylindres pour s'y cacher. Nous avons dédié une personne dans notre équipe responsable du projet, de telle façon que les animaux verront toujours la même personne s'occuper d'eux, et s'y habitueront. Enfin, les points limite sont déterminés avec discernement pour éviter toute souffrance inutile.

12254 La mise en œuvre de ce protocole vise la compréhension et l'identification de l'anatomie et de la fonction des circuits neuronaux impliqués dans la peur chez la souris. Les objectifs principaux de ce protocole sont triples : premièrement, l'utilisation de modèles comportementaux permettant l'étude de la peur (innée ou conditionnée) chez le rongeur vigile, deuxièmement, l'identification et la manipulation des structures cérébrales et circuits neuronaux permettant l'expression et/ou l'inhibition des réponses comportementales de peur et troisièmement la caractérisation anatomique de ces circuits. L'utilisation d'un modèle comportemental chez le rongeur permettant l'étude des structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués dans les réponses de peur nous permettra à terme le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour des pathologies telles que l'anxiété ou le syndrome de stress posttraumatique.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer: ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'identification des structures cérébrales et des circuits neuronaux impliqués au cours de la peur nécessite l'utilisation d'un cerveau

intact chez l'animal vigile. Des méthodes in vivo telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne contiennent pas les connexions neuronales qui sont le sujet de nos travaux. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire: le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est donc de 15 souris par groupe, soit un total de 1515 animaux pour la réalisation de ce protocole.

Raffiner: afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes seront utilisées. Nous appliquons également systématiquement un traitement antalgique (Métacam, 0.01 ml, 5mg/ml, i.p.) avant et trois jours suivant les actes chirurgicaux. La chirurgie est réalisée sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Pour identifier les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons défini des points finaux établis sur la base de la grille d'évaluation de Morton et Griffith établie en 1985. Cinq aspects sont évalués au cours de nos expériences et nous aident à déterminer un point final à l'expérimentation. Ces critères sont : la variation du poids de l'animal, son apparence physique (est-ce qu'il se toilette correctement et le poil a-t-il un aspect brillant), les signes cliniques observables que sont la fréquence cardiaque et respiratoire, les changements comportementaux non provoqués et la réponse à des stimuli environnementaux. Chaque critère est évalué de 0 à 3, si un critère obtient un score de 3, ceci induit un arrêt immédiat de l'expérience et l'euthanasie de l'animal. L'évaluation du poids de l'animal est effectuée de façon journalière à partir du moment où l'animal est isolé en cage individuelle et rentre dans la phase expérimentale. Ces mesures ont lieu lors de la manipulation journalière des animaux. Les mesures sont consignées dans un cahier d'expérience prévu à cet effet.

12255 Le microbiote intestinal joue un rôle dans la susceptibilité aux infections pulmonaires. Il a notamment été démontré que la réponse à l'infection par le virus respiratoire influenza est dépendante du microbiote intestinal, et que celui-ci est nécessaire pour la réponse immunitaire à la vaccination contre la grippe. Le microbiote intestinal joue également un rôle protecteur dans la défense contre la pneumonie à pneumocoques. Le microbiote intestinal influence aussi la résistance à la pneumonie au *Staphylococcus aureus*.

De nombreux facteurs environnementaux influencent le microbiote intestinal: c'est notamment le cas de la pollution atmosphérique, ainsi que de nombreux contaminants alimentaires. Le but de ce

projet est d'évaluer comment ces facteurs environnementaux participent à la susceptibilité et la résistance aux infections pulmonaires.

Les facteurs environnementaux qui seront évalués seront les facteurs prioritaires par rapport à l'état de l'art. Ils concerneront soit la pollution atmosphérique et les polluants seront dans ce cas inhalés, soit les contaminants alimentaires, et les polluants seront dans ce cas administrés par voie orale.

Leur effet sera testé sur 2 types d'infections pulmonaires:

1. Streptococcus pneumoniae (Sp)
2. Haemophilus influenzae non typable (NTHi)

La stratégie d'expérimentation ou d'observation et l'approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées sont détaillés ci-dessous :

Les doses de polluants sont choisies de façon à reproduire chez l'animal l'exposition humaine réelle donc ce sont des doses qui n'entraînent chez le sujet normal (humain ou souris) aucun signe clinique, aucune douleur, aucune souffrance, aucune angoisse.

Le mode d'administration des polluants est choisi également pour réduire le mal-être des animaux: Concernant l'inhalation, elle se fait par nébulisation dans une chambre corps entier où les souris peuvent se mouvoir librement. Elle est limitée au maximum à 4h par jour en dehors desquelles les souris sont hébergées normalement. Un processus graduel d'acclimatation à cette inhalation est tout de même mis en place afin d'habituer progressivement les souris à ces phases quotidiennes d'inhalation.

Concernant les contaminants alimentaires, ils sont administrés par gavage par des personnes expérimentées et totalement compétentes par leur gestes précis et délicats pour réaliser ces gavages en réduisant au maximum le stress des souris.

Les doses de bactéries pour les infections pulmonaires sont choisies en fonction de la littérature et de notre expérience. A partir de ces données, 3 doses sont choisies pour une première évaluation de la réponse des souris dans l'animalerie concernée. Puis toutes les études suivantes sont réalisées sur une seule dose afin de réduire le nombre de souris utilisées.

Les tests statistiques sont des Mann Whitney adaptés aux petits nombres d'échantillons.

Le nombre de souris est systématiquement choisi de façon à le réduire au maximum. Les groupes présentant une variation biologique faible (typiquement les groupes contrôles) ont un effectif de 6 souris. Les groupes plus variables (les groupes infectés) ont un effectif de 10.

Ces procédures sont définies au mieux pour offrir le maximum de confiance dans les résultats générées dans le respect du bien-être animal en limitant la souffrance animale (Raffiner)

Les processus physiopathologiques complexes des infections pulmonaires faisant intervenir le microbiote intestinal, le système immunitaire inné et acquis, muqueux et systémique, ainsi que dans le cas de ce projet des expositions ciblées à certains facteurs environnementaux, ne peuvent pas être modélisés in vitro (Remplacer)

Ce projet nécessite 208 animaux par bactérie et par type de polluant étudié comme détaillé dans le tableau joint au dossier.

208 animaux multiplié par 2 bactéries=416 animaux

En 5 ans, il est prévu d'étudier 5 polluants donc le nombre total de souris nécessaires est de 2080.

416 animaux multiplié par 5 polluants =2080 animaux.

12256 Actuellement, les cancers sont la 2ème cause de mortalité dans le monde (9,5 millions de décès prévus en 2018) avec 18,1 millions de nouveaux cas diagnostiqués, dont:

-Poumon: 2 093 876 nouveaux cas (84,1% décès)

-Foie: 841 080 nouveaux cas (92,9% décès)

-Pancréas: 458 918 nouveaux cas (94,1% décès)

- Rein: 403 262 nouveaux cas (43,4% décès)
- Vessie: 549 393 nouveaux cas (36,3% décès)
- Prostate: 1 276 106 nouveaux cas (28,1% décès)
- Mélanome: 287 723 nouveaux cas (21,1% décès)

Ces cancers sont des pathologies pour lesquelles de nouvelles options thérapeutiques doivent être impérativement développées. La réalisation d'études précliniques nécessite l'utilisation de modèles animaux reproduisant fidèlement les caractéristiques des tumeurs humaines. Ces tumeurs se caractérisent par une grande variabilité cytogénétique entre les individus et sont également hétérogènes au sein même de la tumeur. La validation préclinique d'un nouveau traitement passe donc par l'utilisation d'un vaste panel de modèles porteurs de tumeurs aux caractéristiques moléculaires variables. Or, jusqu'à présent, les modèles d'étude en oncologie se basent sur les lignées cancéreuses clonales en culture qui, d'une part ne reflète pas l'hétérogénéité de la tumeur in situ et d'autre part, ne permettent pas de reproduire le microenvironnement tumoral dont le rôle dans le développement tumoral et la réponse aux traitements n'est plus à démontrer. Ainsi, malgré le développement de cultures 3D dont la mise en œuvre reste difficile, les modèles animaux s'avèrent donc indispensables. L'approche par xénogreffe chez la souris nude de tumeurs humaines obtenues au moment de la chirurgie, apparaît comme le modèle expérimental prédictif de la réalité clinique le mieux adapté aux études en oncologie. Dans le cadre de ce projet, nous nous proposons de développer de tels modèles expérimentaux afin de disposer d'une importante plateforme de modèles précliniques de cancers représentatifs de l'hétérogénéité de ces pathologies, stables génétiquement et prédictifs de la réponse aux traitements. L'établissement de ces modèles se fait par étapes successives:

-Une primo implantation de fragments de tumeurs de patients en sous cutané chez des souris immunodéficientes.

-Puis des fragments de la tumeur issue de cette première greffe sont à leur tour implantés chez des souris immunodéficientes : c'est ce qu'on appelle un passage.

A l'issue de ce projet, un grand nombre de modèles pourront être proposés permettant une évaluation fiable d'un candidat médicament ou d'une combinaison de molécules pour le traitement des cancers.

L'établissement de ces modèles nécessite une collaboration étroite avec les services hospitaliers de chirurgie.

La réalisation de ces modèles est techniquement difficile à mettre en œuvre du fait d'un taux de prise de greffe très variable, allant de 2% à plus de 50% selon le type tumoral et d'autres facteurs tels que le stade et l'agressivité du cancer.

Pour ce projet la règle des 3R sera respectée de la façon suivante :

-Réduction :

Nous utiliserons un nombre minimal d'animaux nous permettant d'une part, d'optimiser la prise de greffe et d'autre part, d'obtenir assez de matériel à la fois pour le maintien du modèle et les analyses/expériences ultérieures. Nous recueillons par an les tumeurs d'environ 50 patients pour chaque cancer, soit un total d'environ 350 tumeurs. Ainsi sur les 5 ans nous recueillerons environ 1750 tumeurs, tous cancers confondus. Par ailleurs, en tenant compte du taux moyen de prise de greffe (environ 25%) et étant limité par la quantité de matériel biologique, le prélèvement initial (issu du patient) sera greffé au maximum sur 10 souris. Pour l'entretien du modèle, du passage 2 au passage 10 ; 5 souris par passage et par modèle sont suffisantes pour atteindre l'objectif du projet. En conclusion, 27500 animaux seront requis pour les 5 ans de ce projet.

-Raffinement :

Ce projet sera réalisé au sein d'une animalerie agréée et par conséquent les animaux seront manipulés par du personnel habilité et soucieux de leur bien-être. En l'occurrence, le raffinement sera assuré par un enrichissement des cages pour le confort des animaux (des Aspen brick, bâtons à ronger, leur permettant d'assouvir leur besoin de rongement et limitant les querelles entre souris mâles ; des Nestlets, carrés de coton, leur permettant de faire une nidification) . Les souris seront

nourries ad libitum et hébergées en groupe ; elles ne seront séparées qu'en cas de comportement agressif avec induction de plaies. Nous diminuerons la douleur et l'angoisse liées à l'acte chirurgical (xénogreffe en sous-cutané entre les épaules) en opérant sous anesthésie et en appliquant une analgésie locale, pendant la phase de réveil, les animaux seront placés sur un tapis chauffant et surveillés jusqu'à leur réveil. Il est à noter que le développement tumoral en lui-même n'est pas douloureux pour les animaux et ne dépassera pas 1000 mm³.

-Remplacement :

La réalisation d'études précliniques fiables nécessite l'utilisation de modèles animaux reproduisant fidèlement les caractéristiques des tumeurs humaines. Les tumeurs se caractérisent par une grande variabilité cytogénétique entre les individus et sont également hétérogènes au sein même de la tumeur. La validation préclinique d'un nouveau traitement passe donc par l'utilisation d'un large panel de modèles porteurs de tumeurs aux caractéristiques moléculaires variables. Or jusqu'à présent, les modèles d'étude se basent sur les lignées cancéreuses clonales qui ne reflètent pas l'hétérogénéité de la tumeur in situ. Le développement de systèmes de culture 3D est en cours de développement et reste donc difficile à mettre en place. Par conséquent, aucune méthode de remplacement n'existe à ce jour.

12257 La maladie d'Alzheimer (MA) est un sous-type de démence qui représente 50-75% du nombre total des cas et constitue la principale cause de démence chez les personnes âgées. Son impact économique croissant fait de cette maladie une priorité de santé publique mondiale de première importance. Bien que le peptide beta amyloïde et la protéine tau anormalement phosphorylée restent le centre d'intérêt des recherches dans le domaine, l'étiologie de la MA demeure largement mal définie et aucun traitement efficace n'est encore disponible.

Les facteurs de risques cardiovasculaires, au premier rang desquels l'hypertension artérielle (HTA), le diabète, le tabagisme, la dyslipidémie et l'obésité, sont impliqués dans la pathogénèse de la MA. Une angiopathie amyloïde cérébrale, une altération de la barrière hémato-encéphalique, des anomalies microvasculaires et un remodelage vasculaire sont fréquemment observés chez les patients atteints de la MA. Ces dysfonctionnements aggravent la MA et pourraient contribuer au déclin cognitif.

Bien que l'angiopathie amyloïde cérébrale soit décrite dans plusieurs modèles de souris transgéniques exprimant l'APP mutée (Amyloid beta Precursor Protein), peu de modèles animaux de la MA présentent un spectre complet du dysfonctionnement cérébrovasculaire, proche du tableau clinique. Nous proposons de mettre au point des modèles expérimentaux combinant MA et traitement au bosentan pour améliorer la vasorelaxation.

Dans le cadre de ce protocole, nous utiliserons les souris transgénique APPPS1 surexprimant l'APP et la préséniline-1 (PS1) humaines mutées. Ces souris recevront per os 100mg/Kg/J de bosentan dans l'eau de boisson pendant 28 jours. Nous utiliserons 200 animaux pour cette étude. Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes suivant l'âge et le poids des animaux. De plus les cages sont enrichies par des jouets et les souris sont surveillées quotidiennement par le personnel animalier et leur poids est suivi pendant au moins 4 jours. Les techniques de remplacement ont été utilisées ultérieurement dans le protocole et il est maintenant nécessaire de valider l'hypothèse in vivo. L'étude comportementale des animaux étant un facteur primordial dans l'efficacité du traitement. Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisé nous avons évalué le nombre minimal d'animaux à utiliser pour obtenir des résultats statistiquement relevant.

12258 Le Myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne ou un cancer du sang C'est une prolifération clonale, dans la moelle osseuse, de cellules plasmocytaires, dérivées de lymphocytes B, qui produisent une immunoglobuline monoclonale.

Le mot multiple se réfère au fait que les cellules malignes s'accumulent et produisent des lésions dans de multiples régions du corps contenant de la moelle osseuse, comme les os plats.

L'objectif principal de ce projet de recherche est de développer de nouveaux traitements contre le myélome multiple.

La cible à détruire est la cellule tumorale, l'arme est le radioélément qui va émettre un rayon « toxique » pour cette cellule. Il faut accrocher le radioélément à un ligand et à un vecteur afin de former un radiopharmaceutique qui doit cibler et détruire la cellule tumorale tout en minimisant l'impact sur les tissus sains.

Nous allons tester un nouveau vecteur couplé à différents radioéléments à différentes doses, l'Astate 211 et un isotope de l'iode seuls et en association. La radiothérapie sera appliquée sur 4 modèles de souris : deux modèles de MM humain greffés sur la souris immunodéprimée, et deux modèles de MM de souris chez la souris immunocompétente.

Au total cette saisine utilisera 1680 souris

Règle des 3R: Remplacer : Le modèle animal est indispensable et non substituable pour déterminer quel système est le plus efficace pour détecter et détruire la tumeur et le moins toxique pour les organes vitaux avant de commencer des études chez l'homme.

Réduire le nombre d'animaux utilisés en réalisant préalablement des tests in vitro sur les cellules tumorales. Statistiquement nous ne pouvons pas réduire d'avantage nos lots de souris. Le nombre d'animaux nécessaires à cette saisine prend en compte cette règle. Raffiner en assurant une surveillance quotidienne par l'expérimentateur dès la période critique et en fixant des points limites stricts qui conduisent à l'euthanasie. Par ailleurs les souris sont groupées à 5 par cage avec des petits morceaux de papiers leur permettant de faire un nid.

12259 La médecine régénératrice s'oriente aujourd'hui vers le développement de techniques chirurgicales de moins en moins invasives dans le but de réduire la morbidité et la durée d'hospitalisation. Cette recherche d'une chirurgie mini-invasive a permis le développement de matériaux injectables (matrices) pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Ces matrices injectables doivent pouvoir durcir une fois implantées chez le patient et présenter des propriétés mécaniques comparables à celle du cartilage. Notre domaine de recherche est la régénération des tissus squelettiques tels que le cartilage. Le cartilage articulaire est sujet à de nombreuses lésions d'origine traumatique, métabolique ou liées au vieillissement. Ces atteintes affectent une part significative de la population humaine, canine et équine et résultent en une dégradation de la qualité de vie des patients et entraînent contre-performance, invalidité, indisponibilité ou réforme pour les filières équine et canine. Ce tissu est dépourvu de capacités de réparation intrinsèques et nécessite le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Des techniques de réparation chirurgicales (microfracture, mosaïcplastie, greffe de chondrocytes) ont été cliniquement utilisées. Cependant, aucune de ces techniques n'a démontré de succès cliniques significatifs et durables.

Dans ce projet, nous proposons le développement et l'évaluation d'un hydrogel d'hydroxypropyl méthyl cellulose silanisé (HPMC-Si)/chitosan-Si associé à des cellules souches mésenchymateuses (CSM) pour réparer des défauts focaux du cartilage canin, une thérapie potentiellement transférable à l'homme.

Par ailleurs, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) apparaissent comme une source prometteuse de cellules capables de se différencier en chondrocytes (cellules cartilagineuses). Il paraît important d'étudier in vivo la capacité chondrogénique de l'association des CSM induites in vitro et de l'hydrogel d'HPMC-Si/Chitosan-Si.

Le Projet présenté ici sera réalisé sur le modèle chien, au total 12 animaux seront utilisés.

Conformité avec les exigences 3R : Remplacement, Réduction et Raffinement :

De précédentes études ont montré que l'hydrogel (HPMC-Si) permettait la prolifération de chondrocytes. La biocompatibilité de cet hydrogel a été testée in vitro. Néanmoins, la capacité chondrogénique de l'association CSM-hydrogel ne peut être démontrée que par une évaluation in vivo. Cette approche est le seul moyen pour valider et conclure à l'efficacité d'un biomatériau. Il implique, par là même, l'emploi des espèces cibles (chien) comme animal expérimental. Le protocole chirurgical est standardisé et assure une mise en place sans conséquences sur l'état

général des animaux. La taille des lots expérimentaux est réduite aux impératifs statistiques (12 animaux au total répartis en 2 lots de 6 animaux par lot). Les procédures douloureuses sont réalisées sous anesthésie générale et un suivi de la douleur avec une grille d'évaluation de son intensité est utilisé pendant la phase postopératoire jusqu'à rétablissement du comportement normal de l'animal. par ailleurs, les animaux sont hébergés par 2 pour leur confort social et sont promenés en laisse quotidiennement. Ils sont manipulés et soignés plusieurs fois par jour par des animaliers dédiés et formés.

12260 Le cancer colorectal (CRC) représente un problème majeur de santé publique en France, 36.000 nouveaux cas sont recensés chaque année. Le traitement a longtemps reposé principalement sur la chimiothérapie cytotoxique mais ces dernières années de profonds changements ont été opérés grâce au développement de thérapies ciblées ou biothérapies. Toutefois, ces traitements restent encore non efficaces dans un grand nombre de cas. Il apparaît essentiel de mieux analyser les différents événements moléculaires et cellulaires intervenant tout au long du processus tumoral intestinal afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Ce projet a pour objectif d'étudier l'impact de la dérégulation de 3 gènes candidats dans le processus tumoral intestinal et de caractériser l'importance des facteurs environnementaux dans le contrôle de la tumorigénèse intestinale. Ainsi, l'essentiel de nos travaux repose sur la caractérisation de modèles murins génétiquement modifiés afin d'étudier l'impact du régime alimentaire, du microbiote et de l'interrelation de ces deux facteurs sur le développement tumoral intestinal. Enfin, nous souhaitons également étudier l'impact de ces mutations sur la réponse chimiothérapeutique. Pour cela, 7 procédures différentes chez les souris adultes nécessitant au total 1480 animaux sur une durée de 5 ans seront réalisées. L'influence du microbiote sera testée suite à des traitements antibiotiques et l'impact d'un régime hyperlipidique sur la croissance tumorale sera évalué. Des animaux de différents génotypes seront comparés à différents temps.

Pour respecter le principe des 3R : • Afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, une surveillance quotidienne sera effectuée et intensifiée pendant les phases potentiellement délétères, en respectant des points limites définis au-delà desquels les animaux seront mis à mort. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Les analyses potentiellement stressantes (échographies et injections intrapéritonéales) se feront sous anesthésie générale. L'échographie permet un suivi de la croissance tumorale au cours du temps limitant ainsi très fortement le nombre d'animaux nécessaires. Cette méthode nous permet de faire des études sur des tumeurs de petites tailles, à des stades précoces, ce qui évite la souffrance engendrée par un développement tumoral important. Une veille scientifique continue sera effectuée évitant ainsi toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. • Un nombre minimum d'animaux sera inclus dans chaque groupe mais toutefois suffisant pour assurer la reproductibilité de l'expérience et appliquer des tests statistiques entre les différentes conditions. L'élevage des souris sera en adéquation avec ce nombre minimal requis.

L'importance des facteurs microenvironnementaux dans le contrôle de la tumorigénèse intestinale a été démontrée. à l'aide de modèles murins génétiquement modifiés. Des méthodes alternatives de sphéroïdes intestinaux ont été développées qui permettent de disséquer les mécanismes moléculaires sous-jacents. Ainsi les résultats de ce projet permettront une meilleure compréhension de l'étiologie du cancer colorectal dans un but de prévention mais aussi de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

12261 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie chronique neurodégénérative très invalidante, présentant des formes cliniques de sévérité variable (récurrente-rémittente, secondairement progressive, progressive-primaire, progressive récurrente...) et pour laquelle il n'existe actuellement pas de traitement curatif. La SEP est une maladie complexe qui résulterait de la combinaison de facteurs génétiques, immunologiques et environnementaux. Elle se caractérise par des dommages affectant les substances blanche et grise dans le cerveau et la moelle épinière. Ces atteintes se développent dans un contexte d'inflammation chronique. Les traitements actuellement disponibles ciblent la réduction des poussées inflammatoires et sont essentiellement utilisés contre la forme

récurrente-rémittente. Ils n'ont pas d'effet sur la réparation des dommages tissulaires responsables du handicap, et bien qu'ils ralentissent la progression de la maladie, ils ne peuvent l'enrayer. Par ailleurs, la forme progressive est peu sensible aux anti-inflammatoires, ce qui suggère que d'autres mécanismes seraient susceptibles de contribuer à la progression des lésions. Certaines observations récentes chez l'homme suggèrent une réduction anormale du débit sanguin cérébral et une possible atteinte des mitochondries. Ces organites responsables de la production d'énergie dans les cellules sont également impliqués dans la régulation de la mort cellulaire. Ces dysfonctionnements qui pourraient être prévalents dans la forme progressive de la SEP, n'ont pas été formellement démontrés. Si tel était le cas, de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le métabolisme énergétique et/ou le débit sanguin cérébral pourraient être explorées. L'objectif de ce projet est de rechercher sur un modèle murin évocateur de la SEP l'existence de ces dysfonctionnements en utilisant des méthodes d'imagerie et de spectroscopie de résonance magnétique (IRM et SRM) non-invasives. Le modèle utilisé est l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) obtenue par injection chez la souris d'un antigène de la myéline (peptide MOG33-55). L'EAE permet d'étudier l'attaque inflammatoire initiale, et les atteintes des substance blanche et grise. Les animaux seront explorés durant les phases inflammatoire et chronique de la maladie par des méthodes permettant d'étudier le métabolisme des mitochondries, l'inflammation, les dommages du tissu cérébral, et de mesurer le débit sanguin cérébral. Ce projet nécessitera l'utilisation de 136 souris adultes sur 5 ans. Les animaux seront explorés sur des spectromètres imageurs précliniques dédiés à la souris. Cette étude sera conduite dans le respect du principe éthique des 3 R. Le recours à l'animal étant incontournable, nous veillerons à réduire le nombre d'animaux grâce à l'utilisation de méthodes d'exploration non-invasives permettant le suivi longitudinal d'un même animal et l'emploi de tests statistiques pour le calcul de la taille des effectifs. Le raffinement concernera la diminution du stress et de la douleur. L'anesthésie sera utilisée pour l'induction de l'EAE et les explorations par IRM/SRM. Une échelle clinique adaptée à l'EAE sera employée pour le suivi quotidien des animaux après induction de la maladie avec un respect strict des points limites préalablement définis. Un délai d'acclimatation minimum de 10 jours et une habitude à l'expérimentateur seront assurés. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux, avec cycle jour/nuit, nourriture et boisson ad libitum et enrichissement environnemental. Les cages contiendront des rondins de bois à ronger, du coton pour la nidification, un refuge en plastique, et une roue fast-track avec igloo afin de diminuer les comportements agressifs et réduire l'ennui, et favoriser l'expression d'un maximum de comportements naturels (interactions sociales, locomotion, élimination, marquage, repos, fabrication d'un nid, recherche de cachette...).

12262 L'objectif du projet est d'évaluer la cinétique de l'assimilation de l'aliment chez le bar *Dicentrarchus labrax* en croissance au niveau individuel. L'une des hypothèses est que l'assimilation de l'aliment est variable d'un poisson à l'autre, et que par conséquent, ces critères d'assimilation pourraient être utilisés dans l'évaluation de l'efficacité alimentaire pour pouvoir, par la suite réfléchir aux moyens d'amélioration génétique de l'efficacité alimentaire. Actuellement, l'une des méthodes les plus simples pour mesurer l'efficacité alimentaire des poissons est de les élever en aquariums isolés et de mesurer la croissance des poissons en fonction de la ration alimentaire donnée. Cette ration est généralement calculée pour être en deçà de l'optimum, ce qui permet de faciliter l'expérimentation. Cependant, il n'a pas été mis en évidence jusqu'à présent l'impact d'une telle restriction sur les estimations d'efficacité alimentaire chez le poisson. Il est donc nécessaire de trouver d'autres critères liés à l'efficacité alimentaire qui seraient plus simples à mesurer mais tout autant variables.

Au démarrage de l'expérience, l'aliment des poissons sera changé (avec un aliment ayant une signature isotopique en C et N différente du précédent aliment) puis des prélèvements réguliers de quelques écailles pour chaque poisson seront réalisés. Les quantités d'isotopes stables C et N seront ensuite mesurées par analyses spectroscopiques.

Le projet sera réalisé sur un groupe de 150 poissons, dont seulement 90 seront prélevés régulièrement permettant une estimation précise et fiable de l'assimilation des poissons. Les 60

autres poissons permettront d'évaluer l'impact des prélèvements d'écaillés sur les performances de croissance des poissons.

Les poissons seront issus de 3 populations de bars différentes (Atlantique, Méditerranée Ouest et Méditerranée Est) qui ont déjà montré de fortes variations pour un grand nombre de caractères, dont la croissance. Les effectifs ont été calculés à partir des connaissances que nous avons et de la littérature pour assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés (Réduction). La mise au point d'une méthode fiable d'évaluation de l'évolution de l'assimilation permettra d'estimer la variabilité de ces caractères pour, par la suite, pouvoir envisager un programme de sélection génétique précis et largement moins stressant pour les poissons que les méthodes actuellement envisagées.

Pour réduire la souffrance et l'angoisse, les animaux sont manipulés uniquement sous anesthésie pour toutes les mesures individuelles et sont disposés dans un bassin leur permettant de nager librement, avec des densités équivalentes à celles trouvées dans la profession (Raffinement).

Ce protocole ne comporte pas de Remplacement, la mesure sur les poissons des caractères étant pour l'instant nécessaire.

12263 Les vecteurs recombinants Adeno-associés (rAAV) sont des vecteurs de choix pour le traitement de maladies génétiques car ils assurent un transfert de transgènes thérapeutiques sûr et efficace dans différents tissus et organes, permettant de traiter un large éventail de maladies. Toutefois, l'administration unique d'un vecteur rAAV induit le développement d'une réponse immunitaire humorale persistante contre la capsidie qui compromet une deuxième administration, parfois nécessaire pour assurer une continuité d'expression du transgène dans le temps et l'espace. De plus, la séroprévalence pour l'AAV dans la population humaine étant relativement importante, un grand nombre de patients, séropositifs pour l'AAV, ne pourront bénéficier du traitement par thérapie génique.

Nous avons développé une nouvelle approche thérapeutique visant à moduler une réponse immunitaire anti-AAV préexistante et nous souhaitons en tester l'efficacité chez le macaque en injection intraveineuse conjointe avec le vecteur AAV8.

Ce nouvel agent modulateur a déjà fait l'objet d'un essai clinique chez l'homme et il a démontré son efficacité sur des patients transplantés.

Les résultats obtenus à partir de cette étude sur le primate pourraient avoir un impact majeur en thérapie génique utilisant les vecteurs AAV. Actuellement, les sujets séropositifs pour l'AAV, jusqu'à 60% de la population, sont exclus des essais de thérapie génique. De plus, il est actuellement impossible de ré-administrer les vecteurs AAV, à cause de la réponse immunitaire engendrée après perfusion du vecteur, qui persiste à des titres élevés pendant plusieurs années. Or, la ré-administration de vecteur AAV sera probablement nécessaire dans le traitement de certaines maladies montrant une létalité précoce, pour lesquelles l'expression du transgène ne serait pas persistante.

Sept singes (*Macaca fascicularis*) mâles (2-3 ans, 2-4 kg) séropositifs pour l'AAV8 seront inclus dans l'étude et répartis en deux groupes. Sous anesthésie, selon les groupes, ils recevront :

- soit une administration simple de vecteur rAAV8 porteur du transgène rapporteur FIX (facteur IX de coagulation) sans immunosuppresseur, par voie intraveineuse à D0 : groupe 1 (n= 3 animaux)
- soit une simple ou double administration de composés immunosuppresseurs (à D-1 et +/- D0) et de vecteur rAAV8 porteur du transgène rapporteur FIX, par voie intraveineuse à D0 : groupe 2 (n= 4 animaux).

Les animaux seront prélevés au niveau sanguin avant injection pour valider leur statut sérologique vis à vis de l'AAV8 et évaluer leurs paramètres sanguins (biochimie et numération formule sanguine), puis à différents time points de l'étude. Au cours de cette étude, 2 animaux appartenant au groupe 1 seront en outre suivis dans le cadre d'une étude cinétique après administration à D35 puis D36 du traitement immunosuppresseur afin de documenter la réponse immunologique à ce

traitement de manière plus fine par recherche des anticorps anti-AAV dans le sérum des animaux au cours de la période couvrant la fin du protocole (D35 à D50).

A la fin de l'étude (50 jours pi) les animaux seront euthanasiés pour une analyse des organes.

Amendement au projet : 2 animaux de l'étude seront réinjectés à D90 (de l'étude principale) afin d'évaluer la possibilité d'une ré-administration du vecteur rAAV testé, ce qui serait très prometteur pour les futurs essais cliniques en thérapie génique. Le protocole de ré-injection consistera en une double administration de composés immunosuppresseurs (à D-2 et D-1) et de vecteur rAAV8-FIX, par voie intraveineuse à D0. Suite à cette ré-injection et à un suivi de 21 jours, ces 2 animaux seront euthanasiés pour analyse des organes comme les autres primates de l'étude.

Règle des 3R :

1) Remplacer : les études réalisées chez le singe apportent les meilleures connaissances transposables à l'homme en termes de toxicité, d'efficacité et d'immunogénicité de l'AAV. La complexité des réactions immunitaires en jeu devant être étudiées ne permet pas le recours à des méthodes substitutives, telles que les études in vitro isolées et justifie notre recours à des animaux.

2) Réduire : cette étude inclue un faible nombre d'animaux et ne duplique aucune autre étude déjà réalisée chez le macaque. Elle fait suite à la réalisation d'études in vivo menées chez le rongeur, ayant permis de démontrer l'efficacité du traitement à partir de souris immunisées passivement avec des IgGs humains. D'autres expériences in vitro, également réalisées, ont confirmé l'efficacité de l'endopeptidase sur les IgG totaux et a fortiori sur les IgGs anti-AAV spécifiques. Grâce à ces études préliminaires, la preuve de principe pour ce nouveau traitement immunosuppresseur a pu être établie et un brevet a été déposé.

Au cours de cette étude chez le primate, le nombre d'animaux (n=3 à 4/groupe) utilisé est réduit à son minimum pour une exploitation possible des résultats. Une étude statistique ne sera réalisée que dans la mesure où un effet évident du traitement immunosuppresseur pourra être mis en évidence (tests tels qu'un T-test non paramétrique).

3) Raffiner :

L'état général et l'alimentation des animaux seront surveillés quotidiennement (techniciens animaliers et vétérinaire). Des protocoles anesthésiques seront mis en place selon la procédure à réaliser. Les administrations expérimentales (injection intraveineuse du traitement immunosuppresseur et du vecteur) se dérouleront sous anesthésie générale. Les prélèvements sanguins seront effectués sous anesthésie de courte durée (environ 10 min.). Ces actes étant peu douloureux, aucun protocole analgésique ne sera mis en place d'emblée.

Pour favoriser les échanges sociaux et le bien-être, les macaques seront hébergés par groupes de 2 ou 3 dès que possible. Un programme d'enrichissement est également en place pour les macaques et regroupe un certain nombre d'activités :

- distribution de fruits frais/secs cachés dans la litière ou déposés en hauteur
- visionnage de films ou autres documentaires animaliers
- mise à disposition de jouets type Lego ND ou autre
- aménagement de l'habitat pour un à deux primates ou hébergement en volières en groupes dès que possible pour favoriser les déplacements verticaux.

12264 L'Ecole du poulpe est un exposé présenté en salle de biologie animale du Palais de la découverte. Un poulpe commun (*Octopus vulgaris*) a suivi un apprentissage : il a appris à ouvrir un bocal pour y chercher sa nourriture, en l'occurrence un crabe bien vivant.

Mais pour atteindre le bocal fermé, le poulpe va devoir franchir un obstacle : il s'agit d'une cloison transparente percée en son centre par un trou (trou dont le diamètre est supérieur au diamètre de l'œil de l'animal). Cette cloison sera positionnée au milieu de son aquarium.

Cette expérience, présentée au public (scolaire et tout public), est commentée en direct par un médiateur scientifique. Ce dernier présentera la biologie et les caractéristiques du poulpe, il

expliquera les méthodes d'apprentissage employées et comparera les performances de ce mollusque céphalopode à celles d'autres animaux.

L'exposé dure 45 min avec un travail spécifique du poulpe de 15-20 min environ.

La méthode d'apprentissage utilisée est le conditionnement opérant à renforcement positif. Le poulpe apprend un geste qui est associé à une récompense (de la nourriture). L'apprentissage s'effectue dans un aquarium situé dans nos locaux techniques et donc non visible du public.

D'une durée de 15 jours environ, l'apprentissage s'effectue par étapes successives. Dans un premier temps, on propose au poulpe un bocal transparent ouvert contenant un crabe. L'animal a droit à 10 essais de 2 min c'est-à-dire que si au bout de 2 min il n'a pas capturé le crabe, on enlève le bocal et donc le crabe et on renouvelle l'expérience 10-15 min plus tard. Dès que le poulpe capture le crabe dans le bocal ouvert, nous allons passer à l'étape suivante : fermer progressivement le bocal. Le bocal sera dans un premier temps à moitié fermé puis complètement fermé. Confronté la première fois à un bocal fermé par un bouchon en plastique (bouchon enfoncé et non vissé), le poulpe pourra mettre 5-10 min avant de réussir à l'ouvrir. Au fur et à mesure des essais, il va acquérir sa propre technique d'ouverture du bocal et quelques secondes lui suffiront à accéder à son repas. La cloison transparente lui sera par la suite proposée. En explorant ce nouvel objet dans son environnement, l'animal va très vite localiser le trou lui permettant d'atteindre sa récompense (le bocal contenant un crabe).

L'apprentissage terminé, le poulpe sera placé dans l'aquarium de présentation en salle d'exposé. Après une semaine de familiarisation à ce nouvel environnement, le poulpe pourra « travailler » devant le public.

Nous ne présentons au public qu'un seul poulpe et en hébergeons 2 pendant la phase de transition entre la retraite d'un poulpe et l'habituation de son remplaçant

Pour la durée du projet (5 ans), nous utiliserons 4 poulpes

Pour respecter le bien-être de cet animal, nous mettons tout en œuvre pour éviter de lui causer souffrance et stress. Il n'y a jamais de manipulation de l'animal sauf lors du passage dans l'aquarium de présentation face public. A ce moment-là, tout sera mis en œuvre pour que l'acclimatation se fasse dans les meilleures conditions mais aussi pour minimiser les manipulations directes.

Une observation quotidienne et attentive du poulpe permet de détecter tout changement de comportement ainsi que la présence éventuelle de blessures.

Les aquariums de dimensions raisonnables sont agrémentés de roches vivantes aménagées de façon à ce que le poulpe puisse s'y cacher et s'y camoufler. Des pots en terre lui sont proposés pour faire office de terriers. Des coquilles vides de mollusques bivalves, des cailloux de tailles, de formes et de textures diverses sont à sa disposition et à son entière manipulation.

Les différents paramètres physico-chimiques de l'eau de mer (pH, température, salinité, concentration en nitrates...) sont vérifiés régulièrement.

12265 Les muscles squelettiques assurent de nombreuses fonctions au sein de l'organisme. Aussi, leurs altérations peuvent avoir des répercussions sur la fonction motrice et la qualité de vie des patients. Avec l'âge, une diminution de la force et de la masse musculaire est observée, on parle de sarcopénie, avec des conséquences sur la mobilité et l'autonomie des personnes âgées. L'industrie du secteur agroalimentaire ou pharmacologique s'oriente vers le développement de produits qui visent à inverser ces altérations liées à l'âge. Notre équipe développe un ensemble d'approches expérimentales afin d'évaluer l'efficacité de nouveaux produits, alimentaire ou pharmacologique, pour le maintien ou l'amélioration de la fonction musculaire. Ainsi, nous envisageons de tester 5 produits en 5 ans.

Pour chaque composé testé, des rats Wistar âgés seront traités pendant une durée définie en fonction du composé et de l'objectif visé. Le traitement s'effectuera par voie orale via l'eau de boisson ou l'alimentation, et associé au non à un entraînement des animaux. Les animaux seront répartis en maximum 5 groupes, selon le nombre de molécules ou doses à tester et les groupes référents nécessaires, avec un effectif de 30 animaux par groupe.

Un ensemble de paramètres seront évalués pour l'étude des effets des composés sur le comportement général et la fonction motrice des animaux. Ainsi, le poids des animaux, leur consommation alimentaire et hydrique seront évalués. La force d'agrippement, les capacités de déplacements horizontaux et verticaux, les caractéristiques de marche, l'anxiété des animaux et les fonctions neuromotrices seront également analysés avant, au cours et à la fin du traitement, et ce après une période de familiarisation des animaux avec les différents systèmes utilisés. Cette répétition de mesures non invasives permettra ainsi de suivre régulièrement 1) l'état des animaux 2) les effets des traitements sur chaque animal. Des prélèvements sanguins exhaustifs seront également réalisés afin de réaliser des dosages hématologiques et biochimiques et préparer des sérums pour des analyses de marqueurs circulants. Cette approche in vivo indispensable sera complétée par des techniques in vitro d'analyse de la fonction musculaire en vue d'identifier les cibles d'action des composés. Pour cela, en fin de traitement les animaux seront euthanasiés, plusieurs muscles et organes seront prélevés et pesés, et les propriétés contractiles de faisceaux cellulaires isolés des certains muscles seront analysés.

Ces approches permettront de mettre en évidence au niveau préclinique les effets musculaires de composés à destination de l'industrie agro-alimentaire ou pharmaceutique. Les études conduites sur des animaux âgés nécessitent de tenir compte de leur taux de mortalité. Ainsi, pour avoir un effectif final de 15 animaux par groupe, un effectif initial de 30 animaux par groupe est nécessaire. Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en tenant compte de la validité statistique, des contraintes des modèles et des approches expérimentales. Les méthodes utilisées sont validées et majoritairement non invasives, des périodes d'acclimatation et d'habituation sont systématiquement envisagées. Lors de la réalisation des procédures expérimentales, un renforcement positif par récompense est mis en place pour limiter le stress des animaux. Au final, sur 5 ans, 750 animaux seront utilisés pour mener à bien ce projet.

12266 Le laboratoire étudie les mécanismes moléculaires de l'inflammation chronique. Ce projet propose d'étudier un nouveau régulateur d'une voie de l'immunité innée. Nous souhaitons évaluer l'implication de ce régulateur, via une délétion du gène ou une modulation pharmacologique, dans l'inflammation chronique mais également dans des maladies associées à l'inflammation chronique tels que l'obésité ou encore le cancer.

Dans ce projet, 7 approches complémentaires (procédures) seront utilisées pour évaluer le rôle de cette protéine :

- 1/2. Création de lignées murines
- 3/4. Effet de la délétion dans l'inflammation
5. Effet de la délétion dans le métabolisme énergétique
6. Effet de la délétion dans la tumorigénèse
7. Modulation pharmacologique

Au maximum, 2122 souris pourront être utilisées pour ces 7 procédures.

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant pour obtenir un résultat statistiquement significatif (exigence de réduction).

Le nombre de souris par groupe est fixé selon le nombre nécessaire de souris par procédure (expérience antérieure de l'expérimentateur et complexité de la procédure).

Toutes les expériences sont menées par du personnel formé et compétent. Ces études découlent de premiers résultats in vitro et in vivo non publiés et réalisées au sein du laboratoire ou par nos collaborateurs.

Les souris seront surveillées quotidiennement, ceci dans le but de :

- détecter le moindre signe de souffrance et/ou de détresse de l'animal (exigence de raffinement).
- suivre le développement de la tumeur.

Après injection des cellules tumorales, les animaux sont surveillés quotidiennement et pesés 2 fois par semaine.

Des points limites ont été définis dans le cadre de nos expériences et celles de nos collaborateurs. Dès qu'un animal présente un de ces points limites, il sera pris en charge immédiatement.

12267 Le but de ce projet est d'évaluer dans le modèle animal approprié la protection induite par des candidats vaccins ou des anticorps contre des agents infectieux pathogènes (bactéries, virus ou parasites). Comme préconisé par les autorités de santé, la protection induite par de nouveaux candidats vaccins ou des anticorps doit être évaluée in vivo dans des modèles animaux naïfs ou pré-infectés, en particulier lorsque les corrélats de protection ne sont pas complètement identifiés, ce qui est souvent le cas pour de nouvelles cibles vaccinales.

Des critères de pathogénicité de l'agent infectieux tels que les symptômes cliniques généraux (fièvre, perte de poids...) ou symptômes spécifiques du pathogène (lésions cutanées, lésions des muqueuses...) sont déterminés.

Les objectifs sont multiples et permettent l'évaluation de:

La protection induite par les candidats vaccins ou des anticorps contre une infection.

La réponse immune induite post-infection par les antigènes vaccinaux.

Si des animaux présentent une dégradation de l'état général, des lésions ou des symptômes nécessitant l'euthanasie, celle-ci sera effectuée selon les méthodes réglementaires recommandées. Le degré de sévérité est considéré comme modéré à sévère.

En fin de test, les animaux sont euthanasiés selon les méthodes recommandées par la réglementation, la Structure Chargée du Bien-Etre Animal et approuvées par le Comité d'Ethique. L'ensemble de ce projet peut nécessiter l'utilisation de 30 000 souris, 1 500 rats, 1 500 cobayes, 1 000 hamsters, 500 lapins, 1000 furets et 200 mini-porcs sur une période de 5 ans (basée sur une évaluation des besoins actuels).

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives in vitro pour évaluer les capacités d'un vaccin, d'un anticorps à induire une protection contre une infection à un pathogène ou pour évaluer les réponses immunitaires post-infection. Le recours à l'animal de laboratoire s'avère donc nécessaire.

Réduction :

Chaque étude est revue par les biostatisticiens afin de définir le nombre minimum et suffisant d'animaux requis permettant une analyse statistique des résultats.

Raffinement :

En fonction des pathogènes, une grille d'évaluation des signes cliniques post-infection sera mise en place entre le responsable d'étude, les biostatisticiens et les vétérinaires cliniciens. Cette grille permet d'évaluer le niveau de souffrance des animaux selon des critères cliniques spécifiques du pathogène, par un personnel spécifiquement formé. Dès que le score atteint un seuil jugé critique, les animaux sont euthanasiés avant la fin de l'étude pour abréger leur souffrance. Les animaux sont hébergés en groupe dans des locaux appropriés et dans des cages contenant des enrichissements conformément aux standards réglementaires.

12268 Le cancer colorectal (CRC) représente un problème majeur de santé publique en France, 36.000 nouveaux cas sont recensés chaque année. Le traitement a longtemps reposé principalement sur la chimiothérapie cytotoxique mais ces dernières années de profonds changements ont été opérés grâce au développement de thérapies ciblées ou biothérapies. Toutefois, ces traitements restent encore non efficaces dans un grand nombre de cas. Il apparaît essentiel de mieux analyser les différents événements moléculaires et cellulaires intervenant tout au long du processus tumoral intestinal afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Ce projet a pour objectif d'étudier l'impact de la dérégulation de 3 gènes candidats dans le processus tumoral intestinal et de caractériser l'importance des facteurs environnementaux dans le contrôle de la tumorigénèse intestinale. Ainsi, l'essentiel de nos travaux repose sur la

caractérisation de modèles murins génétiquement modifiés afin d'étudier l'impact du régime alimentaire, du microbiote et de l'interrelation de ces deux facteurs sur le développement tumoral intestinal. Enfin, nous souhaitons également étudier l'impact de ces mutations sur la réponse chimiothérapeutique. Pour cela, 7 procédures différentes chez les souris adultes nécessitant au total 1480 animaux sur une durée de 5 ans seront réalisées. L'influence du microbiote sera testée suite à des traitements antibiotiques et l'impact d'un régime hyperlipidique sur la croissance tumorale sera évalué. Des animaux de différents génotypes seront comparés à différents temps.

Pour respecter le principe des 3R : • Afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, une surveillance quotidienne sera effectuée et intensifiée pendant les phases potentiellement délétères, en respectant des points limites définis au-delà desquels les animaux seront mis à mort. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Les analyses potentiellement stressantes (échographies et injections intrapéritonéales) se feront sous anesthésie générale. L'échographie permet un suivi de la croissance tumorale au cours du temps limitant ainsi très fortement le nombre d'animaux nécessaires. Cette méthode nous permet de faire des études sur des tumeurs de petites tailles, à des stades précoces, ce qui évite la souffrance engendrée par un développement tumoral important. Une veille scientifique continue sera effectuée évitant ainsi toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. • Un nombre minimum d'animaux sera inclus dans chaque groupe mais toutefois suffisant pour assurer la reproductibilité de l'expérience et appliquer des tests statistiques entre les différentes conditions. L'élevage des souris sera en adéquation avec ce nombre minimal requis.

L'importance des facteurs microenvironnementaux dans le contrôle de la tumorigénèse intestinale a été démontrée. à l'aide de modèles murins génétiquement modifiés. Des méthodes alternatives de sphéroïdes intestinaux ont été développées qui permettent de disséquer les mécanismes moléculaires sous-jacents. Ainsi les résultats de ce projet permettront une meilleure compréhension de l'étiologie du cancer colorectal dans un but de prévention mais aussi de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

12269 L'objectif de ce projet est de mettre en évidence, in vivo, une activité antihypertensive de fractions ou extraits alimentaires (FEA) et d'identifier le (ou les) composé(s) actif(s), afin de déterminer le mécanisme de l'activité antihypertensive de ces FEA. Il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de répondre à cet objectif.

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

Nous travaillons dans le souci du respect de la règle des 3 R. Une attention particulière est portée afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. En effet, les animaux seront réutilisés lors de 2 à 3 expériences successives lorsque leur pression artérielle sera de nouveau stabilisée à son maximum (200-210 mmHg). L'enrichissement de l'environnement sera effectué à l'aide de bois à ronger (Briques de peuplier pour rats, Safe) et de la litière en quantité suffisante.

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

12270 Problème majeur de santé publique avec 357 768 nouveaux cas estimés en 2010, les cancers sont devenus la première cause de mortalité en France et dans le monde (13% des décès). Pour comprendre le fonctionnement complexe de la cellule cancéreuse et faire ainsi progresser la prévention, le diagnostic et le traitement des cancers, il est indispensable de disposer de modèles intégrés animaux proche de l'Homme, permettant d'évaluer in vivo l'interaction de ces cellules avec

leur environnement. Les souris représentent ainsi un modèle de choix pour les études menées en cancérologie.

Les cancers sont caractérisés par des altérations portant sur de nombreux gènes. Après une première étape d'analyse *in vitro*, le recours à la souris génétiquement modifiée permet de comprendre le rôle de ces gènes au niveau d'un organisme entier. Notre projet consiste à développer de nouvelles lignées murines pour permettre aux chercheurs d'avoir les outils les plus adaptés à leurs études. Bien évidemment, les lignées ne sont créées que si elles présentent un intérêt biologique potentiel et si elles n'existent pas par ailleurs dans d'autres établissements de recherche. Notre expertise nous permet d'avoir d'excellents résultats et donc de minimiser le nombre d'animaux nécessaires.

Nous prévoyons d'utiliser 172 souris pour les 2 années à venir.

Dans un souci de raffinement, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux. Ainsi, les gestes techniques sont assurés par du personnel qualifié, avec un recours à l'analgésie lors des procédures chirurgicales.

12271 La production de laine en Europe est devenue globalement non rentable, voire indésirable car le revenu de la laine est le plus souvent inférieur au coût de la tonte. En race romane, la toison des adultes montre quelques aptitudes à muer annuellement. Mais un nombre très limité d'animaux muent complètement. A l'inverse, les moutons de la race Martinik Hair muent naturellement chaque année. Nous avons donc décidé de croiser ces deux races afin d'étudier le déterminisme génétique de ce caractère de mue naturelle.

Après des croisements initiaux entre les romanes et les Martinik Hair, la population croisée a été sélectionnée sur le phénotype de mue à l'âge de 7 mois. Pour cela chaque animal est observé et un croquis est réalisé pour déterminer les zones de son corps qui muent. Ce croquis est ensuite analysé par un logiciel d'image afin d'établir le pourcentage de mue de chaque animal.

Les analyses quantitatives réalisées sur ce dispositif montrent que la mue est un caractère fortement héritable, indiquant qu'une sélection génétique est tout à fait possible sur ce caractère.

D'un point de vue scientifique, cette étude représente une première réalisation française et l'opportunité de mettre en évidence les mutations à l'origine de ce phénotype. D'un point de vue agronomique, la mue naturelle des moutons offre une alternative à la tonte, source de stress pour l'animal, de travail fastidieux pour l'éleveur, et présente un intérêt économique majeur pour les éleveurs.

Chaque année, environ 400 animaux sont élevés et sélectionnés sur le phénotype de mue naturelle. Afin de pouvoir génotyper ces animaux et accumuler des données pour mettre en évidence la mutation causale, une prise de sang sera réalisée sur tous les animaux du protocole (soit 800 animaux sur les 2 années). L'analyse génétique des premières générations de sélection a permis de mettre en évidence deux régions influençant la mue. Afin de réellement identifier la ou les mutations causales liées au phénotype de mue naturelle, nous avons besoin d'étudier l'expression des gènes dans le tissu cible : la peau. En effet certains animaux muent complètement et ont une peau "nue", tandis que d'autres conservent leur toison et ont une peau "lainée". Afin d'étudier ce contraste, des prélèvements des deux types de peau seront réalisés sur 30 animaux.

La règle des 3R sera respectée comme suit :

- Remplacement : Les mesures de mue naturelle ne peuvent être réalisées qu'avec l'utilisation d'animaux vivants. Aucune alternative n'existe.

- Réduction : Lors d'un autre projet indépendant, nous avons exploré l'expression de certains gènes de la peau. Ainsi, la comparaison de l'expression des gènes de la peau de 15 individus qui muent et de 15 individus qui ne muent pas du tout nous permettra de bien caractériser une différence si elle existe.

- Raffinement : Les prises de sang seront réalisées par le personnel de l'EU possédant les compétences adaptées et réalisant ce type de prélèvement fréquemment. Les biopsies cutanées seront accompagnées de tranquillisants et d'anesthésiants pour les animaux choisis. Cet essai en

conditions d'élevage n'entraînera pas de souffrance ni de stress en dehors des prises de sang et des biopsies cutanées. Si un animal est malade il sera soigné et retiré de l'étude si nécessaire (la décision sera prise par les animaliers en charge de la gestion du troupeau ovin, avec si nécessaire l'avis du vétérinaire de la structure bien-être animal de l'EU et les porteurs du projet). Le milieu sera enrichi par un disque à mordiller suspendu.

12272 La thérapie génique consiste à introduire dans une cellule malade une copie normale d'un gène afin de corriger ou ralentir la progression d'une maladie héréditaire ou acquise. Les vecteurs recombinants dérivés des Virus Adéno-Associés (AAV) sont des vecteurs de choix car ils assurent un transfert de gène thérapeutique sûr et efficace dans différents tissus/organes (œil, muscle, foie ou cerveau). Il existe différents sérotypes de vecteurs AAV, certains ayant la propriété de cibler un organe ou un type cellulaire en particulier.

Ce projet s'intéresse au transfert de gène au niveau de la rétine. L'œil a pour fonction de recevoir la lumière et de transformer l'énergie lumineuse des photons en influx nerveux, qui est ensuite transmis au cortex visuel et interprété en images. La conversion de l'information lumineuse en information électrique correspond au mécanisme de phototransduction se déroulant dans les photorécepteurs rétiniens (bâtonnets pour la vision nocturne et cônes pour la vision diurne et chromatique). Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) sont indispensables à la fonction et à la survie des photorécepteurs. L'objectif du projet est d'évaluer et de comparer le tropisme de vecteurs AAV modifiés chimiquement afin d'améliorer leur tropisme pour les photorécepteurs après administration sous rétinienne chez le rat et intra vitrénienne ou sous rétinienne chez le macaque fascicularis.

Pour cela, des vecteurs AAV2 et AAV5 ont été fonctionnalisés par une molécule chimique portant à son extrémité une fonction de reconnaissance spécifique du tissu rétinien que nous ciblerons (EPR). Le but est donc d'associer chimiquement un mannose par liaison covalente à un AAV2 ou AAV5 et d'étudier ainsi le potentiel de l'association mannose-AAV2 (Φ AAV2) et mannose-AAV5 (Φ AAV5) pour la transduction de cellules de l'EPR après injection sous rétinienne ou intra vitrénienne.

Tout d'abord, des vecteurs AAV2 et 5 de type « sauvage » (capside non modifiée) et les vecteurs AAV2 et 5 porteurs du gène rapporteur de la GFP seront injectés en sous rétinien à des rats puis leur expression dans les cellules RPE sera évaluée in vivo par immunofluorescence à partir d'examen du fond d'œil. Après 4 semaines et réalisation d'un examen de tomographie par cohérence optique (OCT) pour évaluer la structure de la rétine, les animaux seront euthanasiés et des analyses de quantification des génomes viraux et d'expression de la GFP seront réalisées afin de comparer la transduction des cellules de la rétine pigmentaire (RPE) par les vecteurs modifiés et par les vecteurs AAV2 et 5 « sauvages ».

Groupes expérimentaux : 3 rats recevront le véhicule (Sham) pour le groupe contrôle puis 4 groupes de 5 rats seront injectés respectivement avec le vecteur AAV2 « sauvage » (AAV2-CAG-GFP), le vecteur Φ AAV2 (AAV2-man-3e6-CAG-GFP), le vecteur AAV5 « sauvage » (AAV5-CAG-GFP) et le vecteur Φ AAV5 (AAV5-man-3e6-CAG-GFP). Les deux yeux des animaux seront injectés. n= 23 animaux au total.

Le démarrage de la suite du projet dépendra de l'observation chez les rats de l'absence de toxicité et d'un haut niveau d'efficacité de transduction pour l'un des AAVs modifiés comparé à l'AAV5 non modifié. Des vecteurs AAV2 et 5 « sauvages » et des vecteurs Φ AAV2 et 5 porteurs du gène rapporteur de la GFP seront alors injectés à des primates afin de tester le potentiel de transduction des vecteurs modifiés et de comparer leur efficacité de transduction par rapport aux vecteurs AAV2 et 5 « sauvages » dans cette espèce. 13 macaques fascicularis seront inclus : 6 recevront le vecteur testé (selon les groupes) via une injection sous rétinienne, 6 autres le recevront via une injection intra vitrénienne (1 animal supplémentaire sera inclus en back up en raison des difficultés potentielles des injections). L'expression du gène rapporteur dans les cellules RPE sera ensuite évaluée in vivo par immunofluorescence à partir d'examen de fonds d'œil. Après 4 semaines et réalisation d'un OCT pour évaluer la structure de la rétine, les animaux seront euthanasiés et des analyses de quantification des génomes viraux et de l'expression de la GFP seront réalisées afin de comparer

la transduction des cellules de la rétine pigmentaire (RPE) par les vecteurs modifiés et par les vecteurs AAV2 et 5 de type « sauvage ».

Groupes expérimentaux : les deux groupes injectés (injection sous rétinienne ou intra vitréenne) suivront le même schéma : un macaque injecté avec le vecteur AAV2-CAG-GFP (2 yeux), un macaque injecté avec le vecteur AAV5-CAG-GFP (2 yeux), un macaque injecté avec le vecteur AAV2-man-3e6-CAG-GFP (2 yeux), un macaque injecté avec le vecteur AAV2-man-3e6-CAG-GFP (1 œil) et avec le tampon (1 œil), un macaque injecté avec le vecteur AAV5-man-3e6-CAG-GFP (2 yeux) et un macaque injecté avec le vecteur AAV5-man-3e6-CAG-GFP (1 œil) et avec le tampon (1 œil).

La constitution des groupes permettra d'obtenir des résultats cohérents et reproductibles. Cela semble être un nombre minimal (chaque animal étant injecté en bilatéral) qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans être excessif. Ce nombre d'animaux permettra une analyse statistique des résultats (ANOVA) afin de conclure ou non à l'efficacité du vecteur étudié.

Le bien-être animal passera par :

- de bonnes conditions d'hébergement selon réglementation en vigueur avec enrichissement du milieu
- un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières) et instauration de points limites pertinents et précoces avec mise en place de mesures adaptées si nécessaire, selon les interventions (anesthésies, traitements analgésiques postopératoires ou euthanasie si pas d'autre alternative)
- la mise en place d'une grille de scoring de la douleur dès que nécessaire pour pouvoir détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates.

L'utilisation d'animaux au cours de ce projet s'avère indispensable car la rétine est une structure complexe composée de multiples couches de neurones et cellules nourricières. Il n'est pas possible de reconstituer cet organe complexe in vitro de façon parfaite.

12273 Le projet, réalisé dans un cadre réglementaire et consistant en deux procédures, a comme objectif d'évaluer ou de donner de premières informations sur les effets indésirables de produits sur des fonctions de reproduction et/ou sur le développement pré- et post-natal de la descendance et/ou sur la santé des individus, évaluation qui peut être requise par les autorités pour les demandes de mise sur le marché de médicaments ou d'enregistrement de produits chimiques (REACH)...

Ce projet se résume en l'administration répétée (quotidienne en général) d'un produit pharmaceutique, chimique, vétérinaire... chez le rat pendant la phase de pré-accouplement, pendant les accouplements, et pendant les premiers stades de la gestation ou pendant la gestation puis la lactation. La voie d'administration est généralement soit celle prévue chez l'homme (produit pharmaceutique), soit orale (produit chimique).

Le rat est l'espèce recommandée par les autorités internationales et couramment utilisée dans les études de toxicologie. Le nombre d'animaux utilisés au maximum dans ce projet est estimé à 23050 (adultes traités + petits naissant suite aux accouplements dans une des 2 procédures). Le nombre d'animaux traités par groupe/sexes (permettant d'obtenir des résultats robustes et d'atteindre les objectifs des études) et les doses initiales utilisées (choisies en vue d'éviter toute toxicité excessive) suivent les recommandations des lignes directrices OCDE ou ICH.

L'hébergement des animaux est individuel afin de protéger les gestations et empêcher les agressivités entre mâles, et peut être recommandé pour certaines voies d'administration (ex: voie dermale pour éviter la contamination entre animaux et garantir la dose administrée sur la peau). Les dimensions des cages sont conformes à la Directive 2010/63 et une attention particulière est apportée à l'enrichissement environnemental.

Lors des études, l'état de santé des animaux est contrôlé régulièrement (observation des animaux et enregistrement des signes cliniques tous les jours, suivi poids corporel et/ou consommation alimentaire au moins une fois par semaine) et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter tout inconfort ou souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir,

mais si la souffrance de l'animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptable.

Des prélèvements comme pour analyses hématobiochimiques et/ou urinaires peuvent être réalisés et une anesthésie est faite avant les prélèvements de sang selon la méthode utilisée. Des prélèvements d'organes pour analyse histopathologique ou des paramètres de sperme sont réalisés après euthanasie et/ou après anesthésie profonde juste avant euthanasie.

Les volumes d'administration des produits et les volumes de prélèvements sanguins sont en accord avec les recommandations EFPIA/ECVAM.

Il n'existe pas de méthode alternative in vitro pour ces types de procédure en raison de la complexité que représentent un organisme vivant et celle des processus de développement des concepts et des échanges dynamiques entre mère et descendance.

12274 Suite à une lésion vasculaire, les plaquettes adhèrent, s'activent et agrègent pour former un clou hémostatique. Dans une artère malade, un processus similaire peut survenir et entraîner la formation d'un thrombus qui est responsable de maladies ischémiques graves comme l'accident vasculaire cérébral ou l'infarctus du myocarde, on parle alors de thrombose artérielle. Cette thrombose représente la complication majeure de l'athérosclérose, une maladie inflammatoire chronique au cours de laquelle, une artère est graduellement épaissie par une plaque fibreuse. A un stade avancé, la plaque occupe une partie importante de la lumière du vaisseau entraînant une sténose artérielle qui modifie profondément la rhéologie locale. S'il est admis que ces modifications de l'écoulement sanguin amplifient la croissance du thrombus, les mécanismes mis en jeu restent mal appréciés. Si à ce jour les principaux récepteurs plaquettaires impliqués dans la thrombose en conditions de flux normaux ont été identifiés, ceux qui jouent un rôle en conditions de flux pathologiques ne sont pas connus. L'objectif de ce projet est d'identifier les récepteurs plaquettaires qui jouent un rôle majeur lors d'une thrombose survenant dans un vaisseau sténosé. Des expériences de thrombose artérielle seront réalisées en formant artificiellement des rétrécissements de différents degrés pour évaluer l'effet de flux pathologiques sur la thrombose et pour identifier les récepteurs plaquettaires impliqués. Ces récepteurs pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Réduction

Un modèle in vivo de thrombose sur carotide sera utilisé. La chirurgie utilisée dans ce modèle a déjà été décrite, publiée et est maîtrisée au laboratoire. Ceci permettra ainsi d'éviter toute mise au point utilisant des animaux supplémentaires.

De plus, le nombre d'animaux utilisés dans chaque groupe sera le plus petit possible, soit 10, afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Ainsi, ces choix permettront de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires.

Raffinement

Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet :

- Hébergement dans des cages munies de particules de bois et enrichies avec un carré en coton compressé et de frisure de papier, afin de permettre aux animaux de réaliser un nid et de compartimenter leur environnement conformément à leurs besoins comportementaux
- Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C tout au long de la procédure afin lutter contre l'hypothermie
- Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée de l'opération.
- Injection d'analgésique et/ou d'anti-inflammatoire pendant et après chaque procédure.
- Pendant toute l'expérience, les animaux sont surveillés par du personnel formé.

Remplacement

Une première partie de l'étude a été réalisée en utilisant un modèle de thrombose ex vivo, disponible au laboratoire. Il s'agit d'un système de perfusion composé de chambres microfluidiques à

géométrie variable de très petite taille couplées à un système de microscopie. Des expériences ont été réalisées à partir du prélèvement d'un donneur de sang consentant afin de caractériser in vitro l'importance des variations de flux. L'utilisation de ce système s'avère toutefois incomplet, ne pouvant reproduire totalement les interactions hémodynamiques présentes dans les vaisseaux. Un total de 380 souris sera nécessaire pour mener à bien ce projet.

12275 L'hypertension artérielle (HTA) est une maladie cardiovasculaire fréquente et grave qui touche près d'un tiers de la population adulte en France. Malgré les médicaments disponibles pour lutter contre l'HTA, elle reste une maladie insuffisamment contrôlée, probablement à cause de son origine multifactorielle.

Dans ce contexte, il est nécessaire de découvrir d'autres cibles pharmacologiques permettant de traiter l'HTA. Parmi ces cibles, une protéine phosphatase dont la dysfonction est associée au diabète, représente une cible de choix.

En effet, l'inhibition pharmacologique et génétique de cette protéine permet d'une part de diminuer les conséquences délétères du diabète dans des modèles animaux diabétiques, et d'autre part de prévenir et de traiter la dysfonction des vaisseaux sanguins survenant au cours de différentes maladies cardiovasculaires et métaboliques associées à l'hypertension artérielle. Nous développerons donc un modèle d'hypertension artérielle de souris.

Notre hypothèse est que l'inhibition de cette cible protéine permettra de diminuer de manière significative les niveaux de pression artérielle. Nous utiliserons des souris de souche sauvage C57/BL6J d'une part, et des souris transgéniques issues d'une invalidation du gène codant la protéine d'étude. Nous avons besoin de l'expérimentation animale car nos mesures sont basées sur l'étude in vivo de l'impact de l'inhibition pharmacologique de la protéine d'étude.

Nous administrerons le produit pharmacologique par voie parentérale en continue sur plusieurs semaines, nous mesurerons l'impact sur les pressions artérielles centrales grâce à une mesure invasive de la pression artérielle. Cette recherche nécessite des expérimentations sur 184 animaux. Cependant pour respecter l'éthique de l'expérimentation animale, nous respecterons la règle des 3R (raffiner, réduire, remplacer), grâce aux stratégies suivantes :

- Pour raffiner ; pour répondre à l'objectif de l'étude, en tenant compte des résultats préliminaires ayant permis de raffiner les aspects méthodologiques per- et post-opératoires et de la variabilité inhérente au modèle expérimental ; des souris mâles sauvages et des souris transgéniques âgées de 6 à 8 semaines seront nécessaires. Les animaux seront hébergés aux normes requises et un enrichissement (plaques de cellulose vierge et des maisons en carton) est mis en place. Enfin, une anesthésie et une analgésie adéquates seront mises en place pour chaque animal en fonction de chaque type de procédure.

- Pour réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à cette étude nous réaliserons séquentiellement des mesures non-invasives (pléthysmographie) puis des mesures invasives (télémétrie) de la pression artérielle, des mesures non invasives de la fonction cardiaque (échocardiographie et imagerie par résonance magnétique) et enfin des études sur des vaisseaux isolés (artériographie sur des artères coronaires et mésentériques) après mise à mort des animaux chez les mêmes animaux. Nous aurons également mis en place une stratégie d'optimisation des prélèvements et des analyses ex vivo au moment du sacrifice. De plus, nous avons réalisé des tests statistiques appropriés pour calculer le nombre de souris nécessaire (test de STUDENT).

- Dans l'objectif de remplacer autant que faire se peut, l'expérimentation animale, nous mettrons en place des cultures cellulaires de cellules endothéliales pour tester les inhibiteurs pharmacologiques d'intérêt. Cependant L'utilisation des animaux est rendue nécessaire car il n'existe pas à ce jour de modèle de substitution à l'expérimentation animale dans l'étude de l'hypertension artérielle.

En conclusion, l'objectif de ce projet est de déterminer l'impact de l'inhibition d'une protéine régulatrice de l'action de l'insuline dans la régulation de la pression artérielle, et développer un nouveau traitement thérapeutique dans l'hypertension artérielle.

12276 Environ 15% des cancers peuvent être attribués à des microorganismes. Le tube digestif est hautement colonisé par des bactéries et plusieurs études suggèrent que des modifications du microbiote sont impliquées dans la carcinogenèse. Il a notamment été montré que la muqueuse intestinale de patients atteints de cancer colorectaux (CCR) est anormalement colonisée par des souches de *E. coli* pathogènes, mais les mécanismes d'actions sur le développement tumoral restent à éclaircir. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet d'une souche bactérienne de *E. coli* isolée d'un patient atteint de CCR sur le développement tumoral, afin de mieux comprendre l'interaction hôtes-bactéries dans le développement du cancer. Nous avons choisi de travailler sur un modèle animal de greffe sous-cutanée de cellules de CCR de souris appelées MC38 chez la souris C57BL/6. Ce modèle animal présente plusieurs avantages pour l'étude du développement tumoral:

- Il est représentatif des relations entre les cellules tumorales et les cellules de l'environnement tumoral puisque les cellules tumorales proviennent de souris C57BL/6 ; cela en fait un modèle idéal pour l'étude de l'interaction cellules immunitaires/cellules tumorales provenant de la même espèce.
- les MC38 sont des cellules de CCR greffées en sous-cutané qui permettront d'observer l'effet des bactéries sur la croissance tumorale, sans avoir recourt à des méthodes d'étude invasives.
- le modèle tumoral se développe assez rapidement (20 jours) et nous permettra d'obtenir suffisamment de matériel biologique pour les études par cytométrie en flux.
- Il sera possible d'évaluer les effets à distance du microbiote intestinal sur la tumeur injectée en sous cutané donc à distance du colon.

L'étude proposée a été définie selon le principe des 3R de l'éthique animale. L'expérimentation animale est indispensable pour ce projet : en effet, il n'y a pas de méthodes alternatives pour évaluer les effets des bactéries du tube digestif sur le développement tumoral. De plus, le nombre d'animaux est réduit au minimum dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet. Le nombre de 10 souris/lot permettra d'analyser statistiquement les résultats (voir détail). Le nombre estimé d'animaux est de 150 souris sur 3 ans (5 lots de souris/expérience ; 3 expériences). Enfin, les conditions d'étude sont adaptées à chaque animal, et améliorées dans la mesure du possible. L'expérimentateur observera quotidiennement le comportement général de l'animal, son apparence (activité, locomotion, état du poil, prostration, vocalise...), le volume de la tumeur et contrôlera la présence d'eau et de nourriture pour chaque cage. Si des signes de douleur se manifestent, une injection sous cutanée de Kétoprophène sera alors réalisée. Si une douleur niveau 3 est constatée, elle sera contrôlée par l'administration quotidienne de Buprénorphine (un antalgique fort, utilisé dans le traitement des douleurs cancéreuses) en sous cutanée. Des pesées régulières des animaux sont prévues tout au long du protocole. Si une perte de poids importante est observée, les animaux seront sacrifiés lorsqu'ils atteindront 80% de leur poids initial. Enfin, les animaux seront sacrifiés s'ils présentent une attitude inhabituelle traduisant un mal-être pendant plus d'une semaine.

12277 La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie très fréquente et invalidante. Il existe plusieurs stratégies de traitement de cette pathologie, mais aucune ne permet une stabilisation complète à long terme et encore moins une rémission.

De nombreux travaux ont permis l'émergence de biothérapies basées sur l'inhibition de certaines voies d'inflammation. Il existe actuellement plusieurs pistes de recherche pour tenter de trouver de nouvelles approches thérapeutiques pouvant remplacer les traitements actuels, en échec dans un nombre important de cas chez l'Homme. Le développement de nouvelles nanoparticules combinant des propriétés thérapeutiques, d'imagerie et de ciblage pour créer de nouvelles stratégies de traitement de l'arthrite est une stratégie d'avenir dans ce domaine biomédical et en plein essor.

Le but de ce projet est d'évaluer la biodistribution et l'efficacité thérapeutique de nanoparticules chez la souris. A ce jour ce projet ne peut être réalisé que sur un organisme vivant. Dans un premier temps, des souris seront utilisées pour évaluer la biodistribution et le temps de circulation des nanoparticules dans le système vasculaire. Ensuite, deux modèles d'arthrite, aiguë ou chronique, seront induits chez les souris et permettront d'évaluer la capacité de nos nanoparticules à se

localiser dans les zones touchées par la pathologie. Enfin, l'efficacité thérapeutique des meilleures nanoparticules sera alors évaluée.

Des points-limites ont été établis et une grille d'évaluation de la douleur a été développée spécifiquement pour ce type d'étude. Un score de douleur trop élevé impliquera l'euthanasie de l'animal avant la fin de l'étude. Le nombre d'animaux a été limité au minimum pour obtenir une puissance suffisante. Des outils d'imagerie seront utilisés pour obtenir le maximum d'informations de manière non invasive et permettre de limiter encore plus le nombre d'animaux dans le futur. Les procédures d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance aux animaux lors des manipulations. Ce projet utilisera au total : 432 souris pendant 5 ans.

A terme, les résultats de ce projet devraient permettre de développer une méthode d'imagerie ainsi qu'un traitement personnalisé contre l'arthrite, avec une perspective d'application chez l'Homme.

12278 Objectif: Évaluer l'activité toxicologique in vivo de nouvelles entités chimiques, produits bio thérapeutiques ou dispositifs médicaux destinés à être utilisés chez l'homme, après administration unique ou répétée par voie entérale (orale ou rectale) ou parentérale (intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, transépithéliale, intranasale, intratrachéale, inhalation, retro-orbitale, oculaire ou topique) chez les rongeurs (rat, souris, hamster ou Cobayes) ou lagomorphes (lapin).

Avantages: Les procédures expérimentales mises en œuvre permettent de documenter l'activité toxicologique in vivo du produit d'intérêt et de définir une dose sans effet indésirable reliée à un niveau d'exposition systémique. Les données obtenues contribueront à la sélection de molécules candidates/dispositifs médicaux, définir les doses pertinentes pour les études long-termes, estimer une marge de sécurité et choisir les doses pour les études cliniques. Aussi, ces procédures adressant la toxicité du futur médicament par une voie systémique (souvent orale) et par une seconde voie (si voie clinique différente) ou du dispositif médical, sont conduites dans le respect des règles éthiques et selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire et ne dupliquent aucune procédure déjà réalisée.

Dommages escomptés: En accord avec les recommandations réglementaires internationales, il est nécessaire de documenter au préalable des études cliniques, l'évaluation de la sécurité du futur médicament/dispositif chez l'animal. La sélection de points limites appropriés et l'utilisation de produits analgésiques (si jugé nécessaire) seront prévues dans ce projet afin de s'assurer du bien-être animal.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucun test réglementaire ou méthode in vitro ou ex vivo validée scientifiquement, reconnus par la législation de l'Union Européenne, qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour répondre aux questions de toxicologie adressées dans ce projet.

Nombre/type d'animaux ; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

Les programmes d'évaluation de la sécurité doivent comprendre deux espèces animales pertinentes, dont une espèce rongeur, choisie pour sa capacité à prédire les effets indésirables susceptibles de survenir chez l'Homme. Les espèces rat, souris, hamster, Cobayes et lapin seront utilisées en raison de l'abondance de littérature sur ces modèles et de l'existence des outils d'analyses ex vivo spécifiques.

Selon les méthodes d'analyses utilisées (réponses cliniques et biologiques) et compte-tenu des variations interindividuelles anticipées, le nombre d'animaux a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet et en accord avec le nombre exigé par les lignes directrices réglementaires. Le nombre prévisionnel d'animaux sur 5 ans pour ce projet (incluant les animaux dédiés à l'acquisition et au maintien des compétences de ce projet) comportant 4 procédures expérimentales, sera de:

17150 rats (études: 16950 rats ; formation: 200 rats), 28750 souris (études: 28550 souris ; formation: 200 souris), 14700 hamsters (études: 14500 hamsters ; formation: 200 hamsters), 14700 Cobayes

(études: 14500 Cobayes ; formation: 200 Cobayes), et 3110 lapins (études: 3060 lapins ; formation: 50 lapins).

Les conditions d'hébergement et de soins, et d'enrichissement ont été choisies de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations française et européenne en vigueur. La stratégie d'enrichissement est régulièrement revue/mise à jour.

Avant toutes expériences, les animaux seront acclimatés pendant une période d'au minimum une semaine et manipulés, afin de les habituer aux expérimentateurs. En cours d'expérimentation, les animaux seront observés quotidiennement (contrôle mortalité, observations clinique) et hebdomadairement (évaluation du poids corporel, de la consommation de nourriture). Ainsi, le bien-être des animaux sera attentivement et régulièrement suivi, permettant ainsi de détecter toute souffrance, angoisse ou signes de stress pour les animaux. L'utilisation de points limites, défini avec l'aide du vétérinaire en charge du bien-être des animaux et toujours évalués ensemble en fonction de leur nature et/ou sévérité, permettra la mise en place d'interventions précoces et adaptées. Une attention particulière est portée sur l'apparition de signes cliniques aigus/sévères (perte d'équilibre, perte de conscience, convulsions, anorexie) et/ou perte de poids > 20%. Ainsi, tout animal exprimant des signes permanents de douleur aiguë ou chronique, qui ne puisse être soulagé par un antalgique (à base de morphinique), et/ou présentant tout signe clinique persistant (notamment lorsque la mort de l'animal semble imminente), sera mis à mort dans les plus brefs délais, en utilisant la méthode la plus adaptée à l'espèce, l'âge, l'état de santé de l'animal et susceptible de causer le moins de douleur et de détresse (conformément à l'annexe IV de l'arrêté relatif à l'agrément des établissements).

12279 Les cellules souches adultes intestinales (CSI) sont essentielles pour assurer l'homéostasie intestinale et la réparation de ce tissu suite aux lésions consécutives à différents stress (infectieux, physique ou chimique). L'objectif de notre projet est de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent l'homéostasie des cellules souches intestinales car un dérèglement de ces processus (facteurs génétiques et environnementaux) est à l'origine des maladies inflammatoires chroniques et du cancer de l'intestin. Il est important de comprendre les bases moléculaires des mécanismes mis en jeu au cours de ces différents processus pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Notre programme de recherche consiste à étudier chez la souris les mécanismes intrinsèques et extrinsèques de protection des CSI utilisés dans des conditions physiologiques ou impliqués en réponse à différents stress (perturbation du microbiote, stress inflammatoire, irradiation, traitements chimio-thérapeutiques, restriction calorique). Nous avons développé différents modèles murins inductibles par le tamoxifène par injection intrapéritonéale qui permettent d'étudier l'influence des facteurs microenvironnementaux impliqués dans la biologie des CSI.

Actuellement, il n'y a aucune méthode alternative pour l'étude de l'impact du microenvironnement sur l'homéostasie des CSI, nous avons choisi le modèle de l'épithélium intestinal murin adulte pour cette étude. Afin de respecter la règle des 3R et de réduire le nombre d'animaux, les expériences mécanistiques et fonctionnelles seront ultérieurement menées en culture d'organoïdes à partir de nos différents modèles murins. Ainsi, la mise au point de culture d'organoïdes fait partie intégrante de nos projets.

Les différentes lignées utilisées dans nos protocoles ne présentent pas de phénotype dommageable. 684 souris seront nécessaires pour mener à bien nos projets et permettre l'analyse statistique des différences observées. Nous allons réaliser 6 procédures différentes chez les souris adultes : Invalidation génique par injection tamoxifène, restriction calorique, inflammation systémique par injection de lipopolysaccharide (LPS), induction de colites inflammatoires par administration de Dextran Sodium Sulfate (DSS), irradiation et injection d'agents chimiothérapeutiques.

Pour respecter le principe des 3R :

Un nombre minimum d'animaux sera inclus dans chaque groupe, nombre toutefois suffisant pour assurer la reproductibilité de l'expérience et appliquer des tests statistiques entre les différentes

conditions.^[SEP] Des approches basées sur la culture d'organoïdes permettront de remplacer certaines études sur l'animal réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

Pour le bien-être animal, leur environnement sera enrichi par des nids végétaux et des tunnels en cartons. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière.

Nous avons défini les variables à analyser et la méthode d'évaluation quantitative du point limite au-delà duquel les animaux seront mis à mort.^[SEP]

Ces études permettront d'une part de contribuer à une meilleure connaissance de la biologie de la CSI et de la régénération épithéliale intestinale et d'ouvrir également de nouvelles pistes thérapeutiques pour lutter contre les maladies inflammatoires intestinales et les effets secondaires des traitements chimio et radio thérapeutiques.

12280 Notre but est de caractériser les complexes moléculaires sous-tendant l'activité électrique des neurones de différentes aires cérébrales en localisant les protéines essentielles à l'activité électrique des neurones par immunohistochimie in situ sur des coupes fines de cerveaux de souris. Pour ce faire il est impératif de préserver le tissu au mieux en figeant les cellules par pontage chimique des protéines entre elles. Une perfusion intracardiaque sur la souris profondément anesthésiée sera réalisée avec une solution de fixateur qui sera distribué rapidement au cerveau par le système circulatoire.

La règle des 3Rs sera appliquée

Remplacement: Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour ce type d'étude.

Réduction : le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permis par la nécessité d'obtenir des résultats statistiquement significatifs et reproductibles. Nous testerons une souris sauvage et une souris transgénique (KO) d'une même portée. Le nombre d'animaux utilisé sera de 140. Ce nombre a été calculé sur la base d'effets à détecter de 30% sur des variables présentant 30% de coefficient de variation, par l'utilisation d'un test de Student non apparié et en considérant une puissance de test de 0.8 (calculé avec le module G*power dans le logiciel R). Ce test statistique justifie de comparer 20 observations ou plus (nombre de tranches de cerveau, en comptant 3 tranches par animal soit 3 x 7 souris) pour chaque expérience réalisée, d'où le nombre total d'animaux donné (140), une fois prise en compte les différentes expériences envisagées (2 anticorps testés par lignée) sur les différentes lignées de souris (5 lignées) ainsi que les animaux contrôles.

D'autre part, les structures cérébrales étudiées ne présentant pas de dimorphisme sexuel, nous utiliserons les animaux des deux sexes. Ceci permettra de limiter considérablement le nombre d'animaux

Raffinement : La souris sera anesthésiée avec une dose provoquant une sédation profonde et rapide. L'évaluation de la profondeur de l'anesthésie se fera par la réduction importante de la fréquence respiratoire et le réflexe de pincement de la patte. Deux souris à perfuser seront séparées de l'élevage, disposées dans une cage enrichie en boîte d'œufs en carton pour s'y réfugier et placées dans une salle attenante à la salle de perfusion. Une première souris sera amenée dans la salle de perfusion où elle sera immédiatement anesthésiée. La deuxième souris sera anesthésiée 30 minutes plus tard.

12281 Le projet a pour objectif la conception et la validation de nouveaux agents de contraste pour le diagnostic précoce du diabète de type 2 par imagerie médicale.

Le diabète mellitus est une maladie chronique caractérisée par une hyperglycémie liée à une dérégulation de la sécrétion de l'insuline ou de son action. Il est estimé que 439 millions d'adultes seront atteints par cette maladie en 2030, dont 90 % avec diabète type 2, ou diabète non insulino-dépendant.

Sur la base de prélèvements obtenus chez l'homme il a été montré que l'on notait chez plus de 90% des patients des dépôts amyloïdes dans les îlots pancréatiques, essentiellement formés d'amyline.

L'amyline est co-sécrétée avec l'insuline, comme réponse à la présence de glucose et précède le début de l'hyperglycémie. Ces dépôts d'amyline constituent potentiellement une bonne cible pour la détection précoce du diabète de type 2, permettant d'améliorer la prise en charge des patients.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'intérêt de nouveaux agents d'imagerie scintigraphique dans des souris saines.

Les dommages attendus chez l'animal sont mineurs puisque l'imagerie in vivo est non invasive et n'engendre pas de douleur particulière aux animaux.

Nous estimons synthétiser 10 nouvelles sondes pendant la durée du projet. Nous estimons utiliser 200 souris maximum au cours de ce projet.

Ces travaux seront menés par imagerie in vivo en répondant aux prescriptions de la règle des 3R : L'imagerie permet de réaliser un suivi longitudinal du même animal et permet donc de réduire le nombre d'animaux mis en œuvre.

L'imagerie in vivo est une modalité non invasive et non traumatisante pour l'animal ce qui constitue une stratégie de raffinement.

Enfin il n'est pas possible actuellement de réaliser une étude de ciblage ou de biodistribution d'un composé uniquement in vitro compte tenu de la complexité d'un organisme entier (remplacer).

12282 Nos sociétés abondantes en aliments très palatables, car riches en sucre et en graisse, favorisent la prévalence de mauvaises habitudes alimentaires dès l'enfance ou l'adolescence. Ces comportements précoces peuvent affecter durablement les choix alimentaires adultes.

Il a été montré que l'adolescence est une fenêtre critique de vulnérabilité au cours du développement cérébral, caractérisée par des comportements spécifiques et une sensibilité accrue aux récompenses. Les données récemment acquises sur le rat indiquent qu'une surconsommation de sucre pendant l'adolescence altère durablement la sensibilité et la motivation à consommer des aliments palatables (dont la qualité gustative et la texture sont agréables au palais) à l'âge adulte et fait émerger un profil comportemental spécifique rappelant la dépression, pouvant être reversé par un antidépresseur. De même, il a été mis en évidence qu'une alimentation hautement palatable à l'adolescence pouvait altérer la maturation des circuits cérébraux du plaisir alimentaire, encore en cours de développement, modifiant ainsi durablement l'impact hédonique des aliments et impactant le comportement alimentaire à l'âge adulte. Des processus neurobiologiques affectant la perception sensorielle plaisante ou non des aliments ont ainsi pu être mis en évidence et il apparaît qu'une modification du plaisir alimentaire et de la sensibilité des systèmes de récompense pourrait être l'un des déterminants clés des dérèglements du comportement alimentaire.

Ce projet consiste à voir si les données précédemment obtenues chez le rat sont répliquables chez la souris. En effet cette espèce de rongeur est un modèle permettant d'obtenir facilement des animaux génétiquement modifiés, facilitant ainsi l'étude et l'implication de certains processus neuronaux. Dans un premier temps une étude comportementale chez la souris sauvage sera menée de la même façon qu'elle a été menée chez le rat. Si ce modèle s'avère viable et que nous retrouvons des résultats comportementaux similaires à ceux obtenus chez le rat, nous pourrons alors utiliser des souris modifiées génétiquement afin de tester l'implication du système de récompense via une approche neurobiologique. Plus précisément nous étudierons les processus impliqués dans le système de récompense par l'utilisation d'outils viraux permettant l'activation ou l'inactivation de certaines voies neuronales d'intérêt.

Ce projet implique au total 336 souris pour lesquelles nous allons respecter au mieux les principes de Réduction, Raffinement et Remplacement. Les effectifs des animaux ont en effet été ajustés au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiques, tout en tenant compte des variations interindividuelles et du pourcentage de perte lors des chirurgies. Les animaux sont hébergés dans des animaleries thermorégulées et disposent d'un milieu enrichi. Ils sont manipulés régulièrement afin d'inhiber tout stress et sont observés quotidiennement afin de réagir au plus vite en cas d'apparition de signes de souffrance. Etant particulièrement vigilants à la prise en charge de la douleur, nous avons mis en place des points limites spécifiques et précoces, des mesures

prophylactiques et analgésiques adaptées, ainsi que des procédures de suivi post-chirurgicales permettant de diminuer au maximum l'impact des chirurgies. Ne pouvant remplacer ce modèle animal par un modèle in vitro, il s'avère que le rongeur est une espèce de choix pour l'étude des processus neurobiologiques, d'une part car il peut être extrapolé à l'homme, d'autre part car il permet des manipulations génétiques non dommageables pour l'animal.

12283 Un faisceau convergent de données épidémiologiques, cliniques et mécanistiques montre un rôle croissant de l'exposition aux polluants chimiques environnementaux ou PCE (Environmental Disrupting Chemicals – EDCs) dans l'incidence et la mortalité par cancer dans les pays occidentaux. Dans ce cadre, il existe un intérêt majeur en santé publique d'identifier ces molécules et de mieux connaître leur impact sur l'homme en particulier sur le risque de développement de tumeurs malignes agressives. Notre équipe est actuellement financée pour évaluer le rôle de certains PCE sur l'évolution vers un stade métastatique agressif du cancer de la prostate. Pour cela, nous souhaitons utiliser un modèle de greffes orthotopiques intraprostatiques maîtrisé dans notre laboratoire pour évaluer le potentiel métastatique de cellules tumorales chroniquement exposées à certains PCE que l'on trouve accumulés dans le tissu adipeux. Le modèle animal utilisé sera la souris NOD-SCID pour sa capacité à tolérer l'implantation de greffes. Le nombre maximal d'animaux sera de 100 ou moins selon les résultats intermédiaires attendus. Le modèle cellulaire utilisé possède un traceur endogène GFP (protéine fluorescente) qui permettra d'évaluer l'étendue de la dissémination des cellules dans les différents tissus. Dans un souci constant de respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été restreint au maximum et défini pour obtenir une puissance statistique satisfaisante à l'issue du protocole. La procédure chirurgicale d'implantation sera conduite sous anesthésie et traitement antalgique. Les animaux seront sous observation quotidienne durant l'ensemble du protocole afin de détecter des signes de souffrances éventuelles induites par la procédure chirurgicale ou la formation de métastases. L'angoisse liée à la procédure sera limitée par un enrichissement renforcé dans la cage de l'animal. En parallèle, la dissémination de cellules tumorales peut conduire à l'apparition de lésions douloureuses pour l'animal. Il est important de noter que les doses d'exposition aux PCE qui seront apportées par l'eau de boisson correspondent à des doses faibles qui sont retrouvées dans les tissus adipeux chez l'homme. Il est donc très peu probable que l'exposition à ces PCE puissent conduire seuls à l'apparition de douleur. Néanmoins, une attention particulière sera apportée à l'évaluation de ce risque, même très faible, en parallèle du suivi quotidien des animaux. Pour cela, nous serons attentifs au cas où un lot présenterait des signes de douleur sur l'ensemble du groupe en l'absence de corrélation avec l'étendue de la dissémination métastatique. Un suivi régulier tout au long du protocole sera mis en place pour évaluer l'apparition de signes de douleur et une prise en charge par traitements antalgiques. Les points limites d'expérimentation seront particulièrement adaptés à ce risque. Les points limites seront identifiés (Hyperactivité, Isolement et indifférence au milieu extérieur, Modifications des périodes de sommeil, Dos voûté, yeux enfoncés, Perte de poids (supérieur à 10%), Tout comportement inhabituel). Ces derniers seront gradués selon un score de 0 à 6 qui conduira à une intervention graduelle sur les animaux. Score 0 : Suivi longitudinal conventionnel, Score 1 à 3 : Évaluation des critères de sévérité des signes de douleur et mise en place d'un traitement antalgique. Score 4 à 6 : Mise en place d'un traitement antalgique systématique. Si l'état de souffrance et/ou sanitaire de l'animal est considéré comme trop dégradé (Score 5 et 6). L'animal sera sorti de l'étude et euthanasié.

12284 Dans la maladie de Parkinson (MP), la dégénérescence des neurones dopaminergiques (DA) d'une petite structure localisée à la base du cerveau, la substance noire pars compacta (SNc) conduit à de graves altérations motrices et cognitives. Les effets indésirables résultant de la pharmacothérapie de substitution de la dopamine à long terme par la L-DOPA, précurseur de la DA, ont conduit à identifier d'autres pistes thérapeutiques. Parmi celle-ci, le venin d'abeille (BV) est un candidat intéressant car il augmente l'activité des neurones et induit une libération de DA dans les structures déficitaires. Pour éviter un choc anaphylactique, des chercheurs ont récemment développé un venin d'abeille sans son composant allergène, le delta venin (delta BV).

Cette étude vise donc à évaluer dans un modèle rat de la maladie de Parkinson, les effets bénéfiques du Delta BV d'abeille, en traitement subchronique basé sur les protocoles de désensibilisation au BV chez l'homme. Ces effets seront évalués dans des tests comportementaux moteurs. Ce projet nécessite donc l'animal vigile et ne peut être remplacé par des expériences in vitro.

Pour faciliter bien-être et interaction sociale, les animaux seront hébergés deux par cage, avec eau et nourriture à volonté. Ils auront à leur disposition de la litière foisonnante (diminuant le stress de l'animal et facilitant sa thermorégulation) ainsi que des bûchettes en peuplier répondant aux besoins naturels des rongeurs. Après une période d'habituation de deux semaines dans leur nouvel environnement (animalerie et congénères), ils seront manipulés quotidiennement pour les familiariser aux expérimentateurs tout au long de l'expérience. Ce projet nécessite d'induire la pathologie de Parkinson chez l'animal à l'aide d'une neurotoxine spécifique des neurones catécholaminergiques, qui détruira progressivement les neurones DA de la SNc. Cette opération sera réalisée sous anesthésie générale, incluant analgésique et myorelaxant. Ce projet, d'une durée de 2 ans, nécessitera l'utilisation de 50 rats male Wistar adultes, répartis en quatre groupes. Ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour avoir des résultats statistiquement fiables. 2 groupes de 10 animaux nous serviront de contrôle : ils seront opérés mais ne recevront pas la neurotoxine. Les 2 autres groupes de 15 animaux chacun recevront la neurotoxine. Les effets comportementaux du delta BV seront ensuite évalués après injection intrapéritonéale (i.p.) dans les différents tests comportementaux et comparés à ceux obtenus après injection de sérum physiologique sans action pharmacologique. L'objectif général du projet est d'étudier l'effet bénéfique du delta BV sur les déficits moteurs engendrés par la MP.

12285 Les maladies neurodéveloppementales de type autisme ou retard mental représentent un enjeu de société considérable. En effet ces maladies, liées au développement anormal du système nerveux se caractérisent par des troubles du comportement, de l'humeur, des relations sociales, et des déficits cognitifs extrêmement invalidants. Il a longtemps été considéré que l'autisme était la conséquence de problèmes dans la relation entre la mère et son enfant. Aujourd'hui, suite aux progrès des connaissances épidémiologiques, génétiques et médicales, on privilégie l'hypothèse physiologique des troubles du syndrome autistique (TSA). Ainsi, certaines mutations comme par exemple dans le gène *Fmr1* sont associées à des TSA dans plus de 30% des cas chez l'homme. Certaines molécules chimiques ont également été mises en cause. Le valproate, une drogue prescrite comme antiépileptique, et le Chloropyrifos, un insecticide, sont tous deux responsables de troubles autistiques et/ou de retard mental chez les individus exposés pendant la grossesse. Mais on connaît encore très mal les mécanismes impliqués dans ces pathologies complexes car le développement du système nerveux implique de très nombreux facteurs en interaction. L'étude de modèles animaux (transgéniques ou exposés à des agents chimiques perturbateurs des systèmes neuronaux immatures) est essentielle pour identifier les mécanismes en cause, les raisons de cette toxicité et les agents auxquels il convient d'empêcher l'exposition du fœtus. Le rat dispose d'un répertoire comportemental plus élaboré et mieux adapté aux évaluations cognitives, et la physiologie de son développement est mieux caractérisée, mais la souris est plus facile à manipuler génétiquement et est donc l'espèce de choix pour les modèles génétiques. Afin d'identifier les mécanismes communs ou au contraire spécifiques aux multiples formes de troubles neurodéveloppementaux selon leur origine génétique ou environnementale, il est nécessaire de mener en parallèle des études sur plusieurs modèles. C'est pourquoi nous prévoyons dans ce projet d'étudier 3 modèles génétiques et 2 modèles pharmacologiques de troubles neurodéveloppementaux, chez le rat et la souris.

Nous allons tester l'hypothèse d'un développement anormal des interactions neuronales au sein des circuits clés de la cognition, ex vivo et in vivo. Les procédures consistent à préparer les animaux (souris transgéniques ou animaux ayant subi une exposition prénatale à des perturbateurs chimiques) aux conditions expérimentales spécifiques (par exemple implantation d'électrodes pour enregistrement in vivo ou prélèvement du cerveau pour enregistrement ex vivo), à examiner

expérimentalement la réponse fonctionnelle des circuits neuronaux et à certains tests thérapeutiques, après quoi le cerveau est prélevé pour caractérisation histologique.

Du fait de l'organisation de notre institut avec deux zones distinctes d'expérimentation animale (dénommées R1 et R2) au sein du même bâtiment mais ayant chacune leur numéro d'agrément, les procédures sont réparties et décrites dans deux saisines distinctes. Certains animaux doivent passer d'une zone à l'autre au fil des procédures. Le transfert se fait dans des cages d'élevage standards munies d'un couvercle filtrant, et prend à peine quelques minutes.

Les avantages escomptés sont une meilleure compréhension du fonctionnement cérébral et de ses pathologies (notamment neurodéveloppementales du type autisme ou retard mental). Les dommages escomptés sont le sacrifice prématuré de rats et de souris et parfois le maintien en cage individuelle pendant la période expérimentale, entraînant un déficit de relations sociales chez ces espèces grégaires. Le projet implique également des interventions chirurgicales (craniotomie) afin d'insérer des électrodes pour enregistrer l'activité cérébrale sur l'animal en comportement, avec l'inconfort associé au réveil post-chirurgical.

Ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement.

L'étude des propriétés des circuits neuronaux impliqués dans la cognition nécessite l'observation et la manipulation de systèmes neuronaux intacts, et ne peut donc se faire que sur l'animal vivant. Il est en effet à ce stade de nos connaissances impossible de modéliser de façon réaliste le fonctionnement cognitif in vitro ou in silico. Nous avons opté pour l'utilisation du rat et de la souris car ils présentent le meilleur équilibre entre les bénéfices (accessibilité expérimentale et pertinence par rapport aux pathologies chez l'homme) et les dommages escomptés (souffrance liées aux conditions d'expérimentation).

Le nombre d'animaux nécessaires pour garantir un pouvoir statistique suffisant pour chacune de nos expériences est ici de 160 rats et 720 souris, répartis sur une période de projet de 5 années.

Les animaux utilisés sont des rats et des souris, dont certaines de lignées transgéniques, modèles de maladies neurodéveloppementales. Ces modèles ont pour but de reproduire les altérations développementales des circuits neuronaux qui sous-tendent la pathologie chez l'homme. Toutefois, aucune étude à notre connaissance ne montre que les troubles associés au développement des circuits neuronaux dans les modèles que nous utilisons soient douloureux pour l'animal, et le phénotype, qui est bien moins marqué que dans la pathologie humaine (pas d'isolement social ou d'auto-mutilations sur nos modèles animaux par exemple), n'est pas considéré comme dommageable. Des éléments de distraction (les animaux sont élevés en cages collectives, autant que possible, selon des normes qui respectent leur besoin d'interactions sociales, et le milieu est enrichi avec du matériel de construction du nid) sont introduits dans les cages d'élevage. Les chirurgies sont réalisées selon le respect des règles d'asepsie, et la douleur prise en charge par traitement pharmacologique. Des points limites sont fixés pour minimiser la souffrance. Pour prévenir, détecter et corriger les conditions de mal-être éventuel, les animaux sont suivis de façon très régulière par du personnel spécialisé, formé et sensibilisé au bien-être animal.

12286 Le diabète est une pathologie en constante progression qui touche plus de 425 millions de personnes à travers le monde. Cette pathologie entraîne une inflammation et un stress oxydant au niveau périphérique mais aussi au niveau du système nerveux central (ex: cerveau). Le diabète est aussi connu pour augmenter le risque d'accidents vasculaires cérébraux et leurs conséquences neurologiques. Des expériences chez la souris et/ou chez le poisson zèbre ont aussi montré que le diabète affectait la création de nouveaux neurones (neurogenèse) et les processus de réparation cérébrale.

De façon intéressante, les niveaux d'adiponectine (une hormone circulante impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique) sont abaissés dans le cas du diabète. Cette hormone est connue pour moduler les taux de sucre, contrecarrer l'inflammation, le stress oxydant et la neurogenèse. Il a été montré que le cerveau des mammifères et des poissons exprimait les récepteurs à l'adiponectine, notamment les cellules souches neurales. Il semble donc possible que l'adiponectine puisse impacter l'activité de ces cellules souches et favoriser la neurogenèse.

Les objectifs de cette étude sont de déterminer si l'injection d'adiponectine ou d'un composé pharmacologique l'adipoRON (qui mime les effets de l'adiponectine, plus facile à produire et moins cher que l'adiponectine) permet :

- de favoriser la neurogenèse en condition basale.
- de favoriser la réparation cérébrale.
- d'améliorer l'absorption du glucose chez un animal hyperglycémique.

Ce projet s'effectuera sur les modèles poisson zèbre (222 animaux maximum) et souris (60 animaux maximum) dans un souci de biologie comparative et de complémentarité des approches. L'utilisation de la souris nous permettra de conforter nos résultats dans un modèle mammifère, plus proche de l'Homme. Le nombre de souris utilisées est moindre car les quantités de matériel extrait (tissu pour analyses) permettent largement d'effectuer les analyses nécessaires.

Afin d'étudier le potentiel thérapeutique de l'adiponectine et de l'adipoRON sur la neurogenèse et la réparation cérébrale, nous injecterons ces composés dans la cavité intrapéritonéale du poisson ou de la souris.

Pour mimer un dommage cérébral chez le poisson, ce dernier sera anesthésié, puis sera lésé au niveau du cerveau avec une aiguille selon un protocole déjà mis au point

Pour mimer un dommage cérébral chez la souris, le modèle d'ischémie cérébrale par MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion) sera utilisé pour bloquer une partie de la circulation cérébrale (et mimer un accident vasculaire cérébral) pendant 90 min selon un protocole déjà validé par plusieurs comités éthiques.

Ainsi :

- 48 poissons maximum seront utilisés pour tester l'effet de l'adiponectine et de l'adipoRON sur la neurogenèse basale, 20 maximum chez la souris.
- 144 poissons maximum seront utilisés pour tester l'effet de l'adiponectine et de l'adipoRON sur la neurogenèse en condition de réparation, 40 maximum chez la souris
- 30 poissons maximum pour tester l'effet de l'adipoRON sur la régulation glycémique.

Cette étude répond à la règle des 3R :

Remplacement : Des tests in vitro ont déjà été réalisés afin de déterminer les concentrations efficaces d'adiponectine (100 microg/g) et d'AdipoRON (5 mg/kg) sur l'inflammation. L'étude menée ici se place à des concentrations montrées comme non toxique sur cellules et chez l'animal (souris) dans de nombreuses publications. Seul le modèle animal nous permet d'apprécier l'impact de ces composés sur la neurogenèse. Il semble donc indispensable de passer au modèle animal pour tester nos hypothèses. Le poisson est un modèle pertinent utilisé par la communauté scientifique pour la compréhension de divers processus physiologiques et pathologiques, notamment de la neurogenèse constitutive et régénérative ainsi que le diabète.

Réduction : les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible, tout en permettant de réaliser des études statistiques (student t-test et ANOVA). La segmentation des études nous permet d'arrêter l'expérimentation en cas de souffrance ou de force statistique suffisante.

Raffinement : les animaux seront placés dans des conditions optimales (poissons : eau en recirculation avec renouvellement, oxygénée, filtrée, contrôlée en température, osmolarité et conductivité ; souris : 5 par cage maximum, atmosphère contrôlée en température et humidité). Ils seront nourris plusieurs fois par jour, et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale. Toutes les mesures seront mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales (anesthésie, analgésie).

Un nombre maximum de 282 animaux sera utilisé dans ce projet (à savoir que ce nombre ne sera pas atteint si les points critiques établis par les réglementations éthiques étaient atteints ou si les tests statistiques sont suffisamment forts pour garantir nos résultats). La lignée de souris utilisée est la C57BL6 et la lignée de poissons AB qui sont des modèles couramment utilisés pour ces études.

12287 Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de morbidité et mortalité au monde résultant de complications carotidiennes et coronariennes. Dans le cas d'un infarctus du myocarde, les patients présentent des signes cliniques liés à l'occlusion d'une ou plusieurs artères : dans le cas de la rupture des plaques d'athérosclérose vulnérables par exemple, la formation d'un thrombus (caillot de sang) peut obstruer une artère qui alimente le cœur en sang et donc en oxygène et entraîner l'ischémie du tissu cardiaque, soit l'infarctus du myocarde.

Les lipoprotéines de haute densité (High-Density Lipoproteins (HDL) sont un complexe lipoprotéique responsable du transport du cholestérol des tissus vers le foie. Ce complexe est connu pour ses propriétés anti-thrombotiques avec un effet protecteur vasculaire, il est souvent qualifié de « bon cholestérol ». Les HDL ont également des propriétés anti-inflammatoires ; elles pourraient alors représenter une cible thérapeutique très intéressante dans bon nombre de pathologies cardiovasculaires chez l'homme.

Dans un projet antérieur sur un modèle murin d'ischémie-reperfusion (I/R) cardiaque, il a été montré que le traitement des souris avec des HDL reconstituées (CSL111) favorise une augmentation de la captation du glucose au niveau du myocarde, une augmentation de la fonction ventriculaire, une diminution de la taille de l'infarctus, une diminution de la fibrose ainsi qu'une augmentation de la densité capillaire au bout de 15 jours de traitement.

A travers l'étude que nous soumettons aujourd'hui au comité d'éthique, nous souhaitons observer la biodistribution des HDL durant les premières heures qui suivent un infarctus du myocarde (0h,1h,4h et 24h) afin de déterminer si les HDL intègrent le cœur et de quantifier les HDL au niveau de la zone ischémiée. Ceci n'a jamais été fait jusqu'à aujourd'hui. Ces expériences sont indispensables pour évaluer les effets in situ des HDL (au niveau du myocarde ischémié) car il est aussi possible que les HDL aient un effet systémique en réduisant l'inflammation. Il est important de comprendre si elles atteignent la zone infarctée et ont un effet direct sur le cœur. L'effet des HDL sur la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde a été démontré chez la souris mais ses mécanismes d'action et potentiels effets secondaires ne sont pas encore connus. Ce projet ayant un objectif thérapeutique (utiliser les HDL comme traitement post infarctus), il est nécessaire de connaître toutes les cibles du HDL pour anticiper son action sur l'organisme complet, et non pas uniquement le cœur. Pour ce faire, nous souhaitons utiliser 30 souris C57Bl/6J mâles âgées de 8 à 10 semaines. Le même modèle murin d'ischémie cardiaque sera reproduit dans ce protocole par la même opératrice expérimentée pour cette technique sur cette souche murine. Nous utiliserons des HDL marquées au Technétium (^{99m}Tc -CSL111) injectées par voie intraveineuse, permettant une analyse d'imagerie non-invasive. Les produits injectés ont été testés in vitro pour s'assurer de leur innocuité. Les doses qui seront utilisées ont déjà été testées chez la souris précédemment sans effets délétères.

Remplacement : L'infarctus du myocarde comprend une nécrose du tissu cardiaque, soit un processus complexe impliquant plusieurs facteurs qu'il est impossible de modéliser in vitro. De plus, l'étude de la biodistribution doit nécessairement se faire sur un organisme dans son ensemble. Nous avons donc besoin de toute la complexité d'un organisme vivant pour mimer la pathologie humaine et procéder à nos observations.

Réduction : Les expérimentations sont conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant de réaliser des études statistiques. L'utilisation de la souche C57BL/6J, étant une population génétiquement homogène, permet de réduire le nombre d'individus nécessaires pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

Raffinement : Durant les procédures chirurgicales, les animaux seront anesthésiés sous Kétamine/Xylazine et maintenus sur un plateau chauffant afin d'avoir un état d'inconscience de qualité et de réduire la souffrance et l'angoisse. Un analgésique (Buprenorphine) sera administré avant la chirurgie afin de prévenir les douleurs per et post-opératoires. Un antisedan (Atipamézole) sera administré à la fin de la chirurgie afin de faciliter le réveil. Les souris seront maintenues dans des conditions optimales de température pendant les 24h post-chirurgie.

Conformément à la réglementation de 2013 concernant l'hébergement des animaux utilisés à des fins scientifiques, les souris sont logées, avant leur utilisation, dans des cages adaptées dans les

salles de stabulation de l'animalerie où l'ambiance est parfaitement contrôlée (température, hygrométrie, ventilation, bruit, cycle jour/nuit 12h/12h, enrichissement des cages). Les souris seront hébergées en groupes sociaux afin de limiter l'isolement. Enfin, des points-limites sont établis, entraînant le retrait ou la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans.

12288 La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie très fréquente et invalidante. Il existe plusieurs stratégies de traitement de cette pathologie, mais aucune ne permet une stabilisation complète à long terme et encore moins une rémission.

De nombreux travaux ont permis l'émergence de biothérapies basées sur l'inhibition de certaines voies d'inflammation. Il existe actuellement plusieurs pistes de recherche pour tenter de trouver de nouvelles approches thérapeutiques pouvant remplacer les traitements actuels, en échec dans un nombre important de cas chez l'Homme. Le développement de nouvelles nanoparticules combinant des propriétés thérapeutiques, d'imagerie et de ciblage pour créer de nouvelles stratégies de traitement de l'arthrite est une stratégie d'avenir dans ce domaine biomédical et en plein essor.

Le but de ce projet est d'évaluer la biodistribution et l'efficacité thérapeutique de nanoparticules chez la souris. Dans un premier temps, des souris seront utilisées pour évaluer la biodistribution et le temps de circulation des nanoparticules dans le système vasculaire. Ensuite, deux modèles d'arthrite, aiguë ou chronique, seront induits chez les souris et permettront d'évaluer la capacité de nos nanoparticules à se localiser dans les zones touchées par la pathologie. Enfin, l'efficacité thérapeutique des meilleures nanoparticules sera alors évaluée.

Des points-limites ont été établis et une grille d'évaluation de la douleur a été développée spécifiquement pour ce type d'étude. Un score de douleur trop élevé impliquera l'euthanasie de l'animal avant la fin de l'étude. Le nombre d'animaux a été limité au minimum pour obtenir une puissance suffisante. Des outils d'imagerie seront utilisés pour obtenir le maximum d'informations de manière non invasive et permettre de limiter encore plus le nombre d'animaux dans le futur. Les procédures d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance aux animaux lors des manipulations. Ce projet utilisera au total : 432 souris pendant 5 ans. Il n'est pas possible à l'heure actuelle de travailler sur un modèle non vivant.

A terme, les résultats de ce projet devraient permettre de développer une méthode d'imagerie ainsi qu'un traitement personnalisé contre l'arthrite, avec une perspective d'application chez l'Homme.

12289 L'urodèle (ordre d'amphibiens qui regroupe salamandres et tritons) offre des possibilités remarquables d'étudier comment les différentes structures cérébrales interagissent pendant l'apprentissage et la prise de décision chez les vertébrés. Premièrement, l'organisation des structures sous corticales de la salamandre partage beaucoup de similitudes avec celle des mammifères et un comportement moteur sous contrôle dopaminergique alors que l'animal est quasiment dépourvu de cortex. Deuxièmement, son cerveau est composé d'un nombre de neurones inférieur au cerveau des mammifères ce qui l'amène à un niveau de complexité traitable plus facilement en terme de modélisation. Troisièmement, l'animal est capable d'apprendre une tâche comportementale. Quatrièmement, les structures cérébrales des salamandres peuvent se régénérer spontanément. Cette remarquable plasticité post-lésionnelle permet l'utilisation de lésions chimiques ou électriques réversibles pour étudier la connectivité et la fonctionnalité de l'encéphale mais aussi de limiter le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude. Ces propriétés font de l'urodèle un modèle unique pour comprendre le rôle fonctionnel des structures sous corticales dans la genèse des comportements indépendamment du cortex. Notre objectif est de développer ce modèle afin d'étudier la pathophysiologie des troubles liés à la déplétion dopaminergique en répondant à deux questions : i) L'apprentissage est-il bien contrôlé par les structures sous corticales chez la salamandre et ii) la dopamine joue-t-elle un rôle crucial comme chez les mammifères ? Si la réponse à ces deux questions est positive, nous disposerons d'un modèle unique d'étude du rôle de la dopamine dans les comportements – et donc de la physiopathologie des troubles engendrés par la déplétion dopaminergique – à un niveau de complexité beaucoup plus faible que ceux dont nous disposons jusqu'à présent. Cette étude répond à l'exigence des 3R. Réduction: nous

utiliserons 90 animaux pour cette étude. Raffinement: Mise en place de points limites et surveillance quotidienne des animaux. Les propriétés de régénération permettent de réutiliser les mêmes animaux. Remplacement: nous substituons l'utilisation de mammifères par des amphibiens. Il est nécessaire d'avoir recours à un système intégré.

12290 Des phénomènes d'induction enzymatique hépatique sont fréquemment observés suite à l'exposition de systèmes biologiques à des xénobiotiques. Ceux-ci pouvant être à l'origine d'un déséquilibre de l'homéostasie, l'étude du potentiel inducteur enzymatique de substances chimiques actives est primordiale dans le processus d'évaluation toxicologique. Pour cela, différentes activités enzymatiques hépatiques sont classiquement mesurées *ex vivo* sur le foie de rongeurs préalablement exposés. Toutefois, bien que certains tests soient déjà mis en place au sein du laboratoire, les techniques se perfectionnent et il convient donc de faire évoluer les méthodes actuellement utilisées pour gagner en sensibilité et en spécificité. Ainsi on améliore la compréhension de l'effet de la substance active sur l'organisme animal (Raffinement) car des biomarqueurs plus sensibles et plus fiables seront disponibles pouvant avec les paramètres classiques nous permettre de diminuer le nombre d'animaux utilisés (Réduction).

Dans ce contexte, le projet prévoit 5 études animales destinées in fine à optimiser et valider de nouvelles méthodes de préparation des fractions subcellulaires et de mesure des activités enzymatiques hépatiques (activités d'isoformes spécifiques de phases I et II). Brièvement, les animaux (rat et souris) seront traités pendant une courte durée (maximum 14 jours) avec des inducteurs hépatiques de référence. A l'issue de la période de traitement, les animaux seront euthanasiés et le foie sera collecté afin d'obtenir des microsomes ou autres fractions subcellulaires. Ces fractions subcellulaires serviront à mettre en place et valider de nouvelles méthodes de mesures d'activités enzymatiques *ex vivo*.

Toutes ces études se feront dans le respect des 3Rs avec un nombre restreint d'animaux. Un total estimé de 650 rats et 650 souris de chaque sexe pourra être utilisé sur 5 années pour raffiner les méthodes actuelles de mesure. Les animaux seront hébergés par groupe ou individuellement si nécessaire avec un enrichissement du milieu adapté à leur âge et à leur espèce. Les animaux seront observés tous les jours (week-ends compris). Des points limites ont été définis par le laboratoire, conditionnant l'appel à un vétérinaire du site. A la fin de chaque étude, une évaluation rétrospective sur le bien-être animal sera réalisée par la structure du bien-être animal et le comité d'éthique.

12291 Le maintien de l'intégrité musculaire a été décrit depuis longtemps comme étant dépendant de l'innervation et de l'exercice. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de l'homéostasie musculaire sont encore mal compris.

Parmi les différents signaux trophiques, l'activité contractile du muscle, la neurotransmission et les facteurs neurotrophiques sont des éléments essentiels qui régissent l'intégrité de la masse musculaire. Une altération de l'activité électrique provoque une modification de l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie musculaire.

Le but de cette étude est donc de déterminer les mécanismes impliqués dans le contrôle de la masse musculaire après une altération de l'activité électrique et d'identifier la part de responsabilité « neurogénique » versus « myogénique ».

Notre précédente étude nous a permis de montrer que la sous-unité CaVb1E du récepteur aux dihydropyridines (protéine impliquée dans la contraction musculaire) et la protéine GDF5, jouaient un rôle très important dans le maintien de la masse musculaire.

Ce nouveau projet aura comme objectif de comprendre les rôles respectifs des protéines CaVb1E et GDF5 au cours du vieillissement, dans un muscle immobilisé ou après l'endommagement d'un nerf mais aussi dans un contexte de dégénérescence musculaire comme dans la myopathie de Duchenne.

Afin de limiter au maximum le recours à l'utilisation de souris pour l'obtention de réponses à nos questions, les expériences seront, dans la mesure du possible réalisées *in vitro* avec des lignées

cellulaires. Ce n'est qu'en dernier recours que nous utiliserons le système murin. De même, les processus expérimentaux seront conçus de façon à utiliser un nombre de souris limité permettant une analyse statistique.

Pour réaliser ce projet nous utiliserons 640 souris C57BL/6JRj jeunes ou âgées et 70 souris dystrophiques dans lesquelles nous étudierons l'impact d'une supplémentation en protéines CaVb1E et GDF5 sur la masse musculaire.

La supplémentation en protéines CaVb1E et GDF5 sera réalisée soit à l'aide d'une protéine recombinante (procédures 1 et 7) soit à l'aide de vecteurs AAV injectés en intramusculaire (procédure 2).

Pour limiter la souffrance et l'anxiété, les procédures telles que les injections en intramusculaire, l'immobilisation ou la dénervation seront réalisées sous anesthésie gazeuse (l'isoflurane 3% en induction et 1.5% en maintien). Pour les procédures pouvant générer de la douleur, les souris seront injectées en sous-cutanée avec 0.1 mg/Kg de Buprénorphine (Vetergesic) à l'aide d'une seringue à insuline 30 minutes avant la procédure puis 24h, 36h et 48h après.

Au cours des différentes procédures, la température des souris est maintenue constante à l'aide d'une plate-forme chauffante.

Les conditions d'hébergement et l'enrichissement du milieu sont gérés par l'animalerie. Elles consistent en un contrôle quotidien des cages, un changement régulier, une gestion pour un nombre réduit d'animaux par cage (5 maximum). Le changement des cages se fait sous hotte aspirante et les cages possèdent des filtres. L'enrichissement du milieu consiste en l'ajout de laine de bois afin que les souris puissent faire un nid ainsi que de lanières de papier Kraft et des tunnels en carton. Enfin, si nécessaire, la nourriture pourra être mise à disposition sur le plancher de la cage.

12292 Le diabète de type 2 est une maladie surtout présente dans les pays développés, qui touche principalement les sujets adultes. Il s'agit de la forme de diabète la plus fréquente. Cette maladie est caractérisée par une résistance à l'insuline par les cellules de l'organisme. Ce qui entraîne dans un premier temps une augmentation de la production d'insuline, puis dans un second temps à un déficit en insuline suite à un épuisement du pancréas. Les traitements disponibles ne sont pas satisfaisants car le corps s'y habitue, il faut donc augmenter les doses et changer de classe thérapeutique. Par ailleurs, ils sont connus pour avoir de nombreux effets indésirables. C'est pourquoi, une équipe de recherche est en train de développer un nouveau traitement.

De nombreuses études in vitro sur des adipocytes primaires humains, disponibles commercialement, ont montré que ce traitement déclenchait une absorption rapide du glucose dans ces cellules humaines. Des études complémentaires in vivo ont ensuite démontré une amélioration dans l'utilisation du glucose au niveau systémique lors d'études de clamps glycémiques, en permettant notamment une diminution de la quantité de glucose circulant dans le sang sans provoquer d'hypoglycémie. La technique de clamp glycémique est une méthode de référence qui consiste à injecter aux animaux de l'insuline pendant une durée de 2-3h et de calculer la quantité de glucose nécessaire en perfusion pour maintenir le taux de glucose constant dans la circulation sanguine. Elle permet ainsi de mesurer plus précisément l'effet de l'insuline sur l'utilisation du glucose par l'organisme, ainsi que son effet sur la production de glucose par le foie.

Il est toutefois intéressant de se demander si cette molécule agit également sur les mécanismes de dépenses énergétiques, ainsi que sur la protection des reins (néphropathie diabétique). Cette complication du diabète résulte d'une atteinte des petits vaisseaux par excès de sucre dans le sang. Si le rein est atteint, et en cas de maladie rénale chronique, les patients risquent à terme de devoir recourir à la dialyse ou « rein artificiel » pour épurer le sang.

C'est pourquoi nous allons étudier l'impact de cette nouvelle molécule sur la fonction rénale chez des souris diabétiques, les complications rénales du diabète ou néphropathies diabétiques étant observées en clinique humaine dans 20% des cas.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante:

(1) REDUCTION: Le nombre d'animaux utilisé sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. Ainsi 8 animaux par groupe seront utilisés. Un total de 24 souris sera utilisé pour ce projet.

(2) RAFFINEMENT: Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes. Les animaux seront hébergés dans les meilleures conditions possibles et bénéficieront d'un enrichissement de leur milieu. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie. Durant les procédures expérimentales, tous les efforts seront entrepris pour minimiser le stress encouru, pour limiter la douleur et la contrainte qu'elles imposeront aux animaux avec un recours à l'analgésie et/ou l'anesthésie ainsi qu'à des temps de récupération entre chaque procédure permettant d'éviter un effet cumulatif.

(3) REMPLACEMENT: des études préliminaires in vitro ont montré que ce traitement entraîne une absorption rapide du glucose dans des cellules humaines. L'approche animale se justifie par l'existence de modèles diabétiques permettant de valider les effets de la molécule thérapeutique dans un organisme entier, mais aussi d'étudier les effets secondaires, dont la néphropathie diabétique

12293 Notre projet consiste à développer une stratégie de thérapie génique pour l'amyotrophie spinale ou SMA.

La SMA est une maladie génétique neuromusculaire touchant environ 1 naissance sur 6 000. Dans 95% des cas, cette maladie est provoquée par une mutation du gène SMN1 (Survival Motor Neuron 1). Bien que ce gène soit exprimé dans l'ensemble des cellules de l'organisme, sa mutation se manifeste par une dégénérescence progressive des neurones moteur (appelés motoneurones) de la moelle épinière, qui conduit à une paralysie et dans les cas les plus sévères à la mort du patient (SMA type 1).

Le but de notre stratégie est de réintroduire dans l'organisme malade une forme fonctionnelle du gène SMN. Pour cela nous faisons de la thérapie génique, c'est-à-dire que nous utilisons comme transporteur des vecteurs dérivés de virus adeno-associé (Virus Adeno-Associated ou AAV) dans lesquels nous mettons le gène SMN fonctionnel (AAV-SMN). Une fois injectés dans l'organisme, les vecteurs AAV pénétreront dans les cellules afin d'y faire exprimer le gène qu'ils contiennent (dans notre cas, le gène SMN).

Une précédente étude menée par notre équipe a montré qu'une injection intraveineuse (IV) de vecteurs AAV (de serotype 9) exprimant le gène SMN (AAV9-SMN) permettait de faire exprimer efficacement la protéine SMN dans un grand nombre de tissus, y compris dans le système nerveux central (SNC).

Dans le but d'optimiser cette thérapie génique, nous comparerons l'effet thérapeutique du vecteur AAV9-SMN lorsqu'il est administré en IV avec une administration directement dans le SNC (afin de mieux cibler les motoneurones) grâce à une injection dans les ventricules du cerveau (injection intracérébro-ventriculaire ou ICV).

De plus nous comparerons l'efficacité de ce vecteur qui s'exprime dans toutes les cellules de l'organisme avec un autre vecteur exprimant cette fois le gène SMN uniquement dans les neurones (AAV9-SYN-SMN). Cette étude nous permettra ainsi de déterminer si la réintroduction du gène SMN uniquement dans les neurones est suffisante pour permettre une thérapie efficace ou s'il est nécessaire de réintroduire ce gène également dans d'autres organes.

Ces vecteurs ont précédemment été testés dans des cellules (tests in vitro) et leur efficacité a été validées. Nous devons donc maintenant vérifier leur efficacité dans des organismes entiers (tests in vivo). Pour cela les vecteurs seront administrés dans une lignée de souris modèle de la SMA

présentant les 1ers symptômes visibles comparable à la maladie humaine à partir de 5 jours et une survie moyenne de 14 jours.

Afin de vérifier l'efficacité de la thérapie, différents paramètres physiologiques seront mesurés (survie des animaux, poids, activité motrice, intégrité des tissus musculaires et nerveux). Les analyses de la survie, du poids et de l'activité motrice nécessitent un nombre minimum de 20 animaux/condition pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Ces données seront complétées par des analyses dans différents organes afin de vérifier la bonne restauration de l'expression de SMN (10 souris/condition). Ainsi, pour l'ensemble de ces expériences, 30 animaux/conditions devront être utilisés. Compte tenu du fait que les vecteurs seront injectés à différentes dose, 120 souris malades seront injectées, auxquelles s'ajoutent 30 souris malades et 30 non malades non-injectées, qui serviront de contrôle.

Ce projet respecte pleinement les règles de réduction, de remplacement et de raffinement. En effet, les tissus d'un même animal serviront pour différentes expériences et, pour chacune d'entre elles, le nombre d'animaux utilisés a été choisi pour permettre d'obtenir des résultats statistiquement interprétables. De plus, des tests in vitro réalisés en amont ont permis de valider les différents vecteurs créés avant de les tester dans nos modèles animaux de la maladie. Ces animaux ayant une durée de vie courte et étant donné la sévérité de leurs symptômes, ceux-ci seront systématiquement euthanasiés dès qu'ils atteignent le point limite. Outre le fait que ces animaux font l'objet d'une surveillance quotidienne (suivi de poids, activité motrice, évaluation du bien-être général, vérification de l'absence de nécroses ou escarres), toutes les précautions sont prises pour optimiser leurs conditions de vie (nourriture disposée dans la cage, environnement enrichi, etc.).

12294 La transduction du signal lumineux en influx nerveux est assurée par les photorécepteurs de la rétine. Il existe deux types de photorécepteurs, les cônes et les bâtonnets. Chaque cône et chaque bâtonnet sont formés d'un segment interne qui contient les organites, et d'un segment externe constitué d'un empilement de disques qui contiennent les pigments rétinien.

Les segments externes se renouvellent régulièrement. Des études passées ont montré que le RdCVF sécrété par les bâtonnets jouait un rôle essentiel dans le renouvellement des segments externes des photorécepteurs à cône. Ce qui est moins connu, ce sont les mécanismes qui permettent le renouvellement des segments externes des bâtonnets et si le RdCVF joue un rôle autocrine dans ce mécanisme. L'absence de modèle cellulaire pertinent nous permettant de répondre à ces questions, nous a amené à créer un modèle murin transgénique permettant le marquage des segments externes lors d'un cycle de renouvellement.

Le croisement de ce modèle avec un modèle de souris déficient pour la protéine RdCVF nous permettra de mieux déterminer le rôle de cette molécule dans le renouvellement des segments externes des bâtonnets. Si le RdCVF joue un rôle, nous devrions voir une altération du renouvellement chez les animaux déficients en RdCVF en comparaison aux animaux contrôles. Si tel est le cas, nous administrerons à l'aide d'outils viraux du RdCVF chez ces animaux afin de voir si nous restaurons ce renouvellement.

Au total, 549 animaux seront nécessaires à cette étude incluant les contrôles.

Ces expérimentations ne peuvent être réalisées in vitro car il n'est pas possible de tester la fonction visuelle in vitro.

Les groupes ont été réduits au maximum pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et permettant de valider l'objectif scientifique de ce projet.

Les souris bénéficieront d'une anesthésie pour certaines procédures et seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries pour s'assurer de leur bien-être. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée.

Les conditions d'hébergement seront adaptées au modèle animal. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

12295 Le tissu adipeux permet le maintien de l'homéostasie métabolique tout en assurant le stockage de l'énergie. Deux types de tissus adipeux ont été décrits chez les mammifères: le tissu adipeux blanc qui stocke l'énergie sous forme de lipides au sein des adipocytes blancs et le tissu adipeux brun, responsable de la production de chaleur (thermogenèse) au niveau des adipocytes bruns. Outre ces deux types d'adipocytes, un troisième type de cellules capables de produire de la chaleur a été identifié au sein du tissu adipeux blanc: les adipocytes beiges. Ils dérivent soit des mêmes précurseurs que les adipocytes blancs, soit d'une trans-différenciation des adipocytes blancs en adipocytes beiges appelée brunissement. Ce brunissement est favorisé par une exposition au froid, une intense activité musculaire ou encore une diète. Le brunissement est très faible ou inactif chez les patients souffrant d'obésité.

L'activation de la thermogenèse au sein du tissu adipeux blanc permet une résistance à l'obésité. De nombreuses équipes cherchent à comprendre les mécanismes contrôlant ce phénomène pour participer à la lutte contre l'obésité.

Pour cela, nous disposons d'un modèle de souris transgéniques mutantes pour un facteur de transcription, EGR1, qui présentent un brunissement spontané du tissu adipeux blanc. Ces souris sont un atout majeur pour comprendre les mécanismes contrôlant le brunissement. Ce phénomène s'accompagne d'une forte consommation de glucose par le tissu adipeux, pour produire de la chaleur. Notre objectif est d'analyser par tomographie à émission de positrons (TEP) au fluorodésoxyglucose 18F-FDG (analogue radiopharmaceutique du glucose) la consommation de glucose au niveau du tissu adipeux et d'autres organes répondant à l'insuline comme les muscles chez des souris contrôles et mutantes pour Egr1 (Egr1^{-/-}). Le nombre d'animaux sera réduit au minimum à savoir 48 animaux : 24 contrôles (animaux sauvages) et 24 animaux génétiquement modifiés Egr1^{-/-}. Dans le cadre du raffinement, aucune intervention invasive ne sera réalisée jusqu'au sacrifice. L'imagerie non invasive, in vivo, sous anesthésie permet des analyses et un recueil de données longitudinales qui contribueront à la réduction et au raffinement. Il est attendu que les souris Egr1^{-/-} présentent une fixation accrue de glucose au niveau du tissu adipeux et des muscles. Toutes ces procédures seront réalisées selon la règle des 3Rs, afin de limiter l'étude au nombre minimal d'animaux et en optimisant les procédures. Il n'existe pas de méthode alternative permettant de réaliser cette étude d'activation de la thermogenèse au sein du tissu adipeux blanc.

12296 Ce projet permet de vérifier l'efficacité de candidats médicaments en utilisant des modèles de pharmacologie chez le rongeur, sur les acouphènes et la perte d'audition.

La perte d'audition et les acouphènes sont deux indications pour lesquelles aucune solution thérapeutique satisfaisante n'existe à ce jour. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les déficiences auditives toucheraient aujourd'hui 15% de la population mondiale. L'impact sociétal est majeur, pouvant entraîner chez les malades, isolement social et dépression. La recherche de thérapies pour le traitement des désordres auditifs est très active, mais les expertises en matière de développement de médicaments incluant les modèles animaux et la mise en œuvre d'une recherche dite « translationnelle » font sévèrement défaut. C'est le contexte dans lequel s'inscrit ce projet qui consiste à générer chez le rongeur, au travers des mêmes causes que celles observées chez l'homme, des acouphènes et/ou une perte d'audition pour vérifier l'efficacité de principes actifs et permettre leur passage en phase clinique.

Le nombre d'animaux à utiliser dans ce projet est dépendant du nombre de candidats médicaments à tester par an.

On l'estime à un maximum sur 5 ans de 5730 rats et 1000 souris.

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

Réduire : Le choix des procédures expérimentales à mettre en œuvre dans le projet tient compte de l'état de l'art et des conseils de scientifiques, experts internationalement reconnus dans le domaine de l'audition. Le nombre de procédures expérimentales est limité aux seules expériences considérées comme indispensables pour démontrer l'efficacité d'un principe actif sur les acouphènes ou la perte d'audition. Toute expérimentation fait l'objet d'un calcul de N permettant de

définir un nombre minimum d'animaux pour mesurer de manière statistiquement représentative une efficacité.

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

Remplacer : L'analyse de l'état de l'art de la recherche préclinique dans l'audition montre que l'utilisation des modèles rongeurs est la seule alternative pour tester l'efficacité des principes actifs avant leur administration chez l'homme. Une veille technologique continue permet de rester vigilant sur l'arrivée de nouvelles techniques qui viendraient se substituer à l'expérimentation animale.

12297 Les maladies du système nerveux (sclérose latérale amyotrophique (SLA), Parkinson, Alzheimer, Huntington, ...) sont une préoccupation croissante en santé publique. De nouveaux outils diagnostiques associés à de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients.

La SLA est une maladie extrêmement invalidante et d'évolution rapide, caractérisée par une dégénération des motoneurons de la colonne vertébrale qui conduit à une paralysie progressive fatale. Elle est due à une mutation (anomalie de l'ADN) qui entraîne une mort neuronale, touchant principalement le cortex et les motoneurons de la moelle épinière responsables des mouvements.

Notre projet a pour but de développer, d'étudier finement une approche thérapeutique basée sur une thérapie génique qui consiste en l'administration d'un gène thérapeutique confidentiel (impliqué dans le métabolisme du cholestérol) au moyen d'un vecteur adéno-associé (AAV) par injection intraveineuse. Le bénéfice thérapeutique attendu est une préservation des motoneurons dans la moelle épinière et ainsi une amélioration des capacités motrices. Dans ce projet, nous souhaitons étudier la survie à long terme ainsi que l'activité physiologique du nerf dans nos 2 modèles murins.

Remplacement : Pour le réaliser, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne permet aujourd'hui d'étudier les symptômes de perte de la locomotion typique de cette maladie. De plus, la souris est un modèle de paralysie moteur déjà utilisé et bien étudié, du fait des similitudes avec la pathologie humaine. Pour ce faire, nous utiliserons 2 modèles murins de SLA.

Raffinement : En cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance. De l'hydrogel pourra être mis à disposition des souris en cas de difficulté à se nourrir, et les souris seront euthanasiés si leur perte de poids est supérieure à 20% de leur poids d'origine. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux.

Réduction : Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de virus à injecter, les temps d'analyses. Ils ont également montré que l'étude de groupes de 25 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs pour l'étude de survie. Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 400 souris. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux et la moelle épinière prélevés pour éviter des doublons des procédures expérimentales.

12298 Il a été clairement démontré que le système immunitaire joue un rôle crucial dans la réponse anti-tumorale ; toutefois les mécanismes moléculaires impliqués restent encore à caractériser. Depuis quelques années notre laboratoire travaille sur la capacité des certains traitements anticancéreux (anthracyclines ou oxaliplatine) à activer le système immunitaire grâce à l'induction de la mort cellulaire. L'utilisation de méthodes de génotypage à haut débit nous a permis d'identifier deux polymorphismes affectant les gènes, FPR1 (Formyl Peptide Receptor 1) et TLR3 (Toll Like

Receptor 3), impliqués dans l'efficacité de la chimiothérapie. Ces mutations ont été corrélées à une plus faible survie chez des patients atteints de cancer du sein, recevant des anthracyclines. Le but de ce projet consiste à évaluer l'implication de l'autophagie (un mécanisme de survie cellulaire) dans la sensibilisation à la chimiothérapie et voir si son activation peut donc compenser les effets provoqués par l'absence des gènes FPR1 et TLR3. Cette question ne peut être abordée qu'in vivo car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale dans des systèmes in vitro. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris immunocompétentes contrôles (n. 1800) et transgéniques (n. 2160) accessible dans le commerce et qui sont viables, fertiles, de taille normale et ne présentent pas d'anomalies physiques ou comportementales. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

12299 Les syndromes d'hypoventilation alvéolaire centrale sont des pathologies qui résultent de désordres neurologiques affectant les centres à l'origine de l'élaboration de la commande respiratoire et en particulier leur chémosensibilité au CO₂/H⁺. Ces syndromes englobent différentes pathologies comme le syndrome d'Ondine qui est associé à la mutation du gène Phox2B. Notre unité de recherche est particulièrement intéressée par ces syndromes en cherchant à mettre au point des approches de diverses natures induisant une élévation de la commande ventilatoire chez ces patients.

Dans le cadre d'études cliniques réalisées au sein de notre laboratoire, une observation a mis en évidence, chez deux patientes adultes atteints du syndrome d'Ondine, une récupération de la chémosensibilité au CO₂/H⁺ corrélée à la consommation de désogestrel, un progestatif de synthèse. Il semble cependant que l'action bénéfique ne soit pas systématique. Nos récentes études chez le rongeur ont permis de relier l'action respiratoire de ce progestatif aux systèmes sérotoninergiques bulbaires et à des structures diencéphaliques.

Parmi les approches en développement actuellement chez l'humain, en particulier au sein de notre unité, la stimulation transcutanée en courant continu (tsDCS) semble apporter des résultats pertinents pour notre problématique. Cependant, peu de choses sont connues sur le plan mécanistique alors que cela permettrait de mieux comprendre mais aussi et surtout de mieux mettre à profit son utilisation notamment dans le cadre de syndrome d'hypoventilation centrale.

Nos objectifs sont doubles : 1/ nous déterminerons les mécanismes impliqués dans les effets respiratoires de la tsDCS au niveau cervical afin de les mettre à profit pour la correction des troubles respiratoires et 2/ nous déterminerons si la neuroplasticité respiratoire induite par la tsDCS peut s'ajouter aux effets bénéfiques des progestatifs que nous avons déjà mis en évidence pour l'obtention d'un effet respiratoire maximum. Les approches utilisées seront des approches non réalisables chez l'Homme. L'utilisation de neurones isolés en culture cellulaire ne permet en effet pas d'appréhender les relations entre les différentes structures neuronales. Les expérimentations à réaliser permettront de mesurer les effets respiratoires et de les coupler à la caractérisation des mécanismes impliqués (régions encéphaliques, populations cellulaires et les systèmes de neurotransmission). Ces expérimentations seront menées suivant 6 procédures expérimentales chez des animaux sauvages et génétiquement modifiés présentant une mutation du gène Phox2B comparable à celle couramment rencontrée chez les patients Ondine. Les effectifs visés doivent se

situer entre 10 et 15 animaux par groupe de façon à mettre en œuvre un calcul de puissance afin d'ajuster au minimum l'effectif d'animaux nécessaire dans chacune des procédures expérimentales. Ainsi, les effectifs envisagés sont de 160 souris adultes. Lorsque cela sera possible, ce seront les mêmes animaux qui seront engagés dans l'analyse de la commande respiratoire et des réseaux neuronaux modulant la respiration et dans l'analyse des populations cellulaires impliquées. Des points limites seront établis afin de réduire toute source d'angoisse et de souffrance et d'assurer le bien-être animal. Le suivi des points limites et l'observation régulière de l'état général des souris permettent d'arrêter à tout moment l'expérience pour éviter l'angoisse et la souffrance de l'animal.

12300 Les animaux utilisent une grande variété de signaux pour communiquer les uns avec les autres. Selon la théorie en communication animale, les signaux conventionnels ne sont pas coûteux à produire, mais sont établis arbitrairement selon une convention sociale de statut, reflétant une motivation ou une habileté au combat. L'honnêteté de ces signaux est alors garantie par des coûts sociaux car les congénères punissent les individus qui transmettent des informations ne reflétant pas leur qualité réelle. Les patches de couleur sont communs chez les animaux et sont souvent impliqués dans la sélection sexuelle, transmettant des informations sur la qualité individuelle. Les couleurs peuvent être de nature pigmentaire (e.g caroténoïde, mélanine), structurale (e.g. ultraviolet), ou un mélange des deux (e.g vert). Les coûts garantissant l'honnêteté des signaux structuraux, tels que l'ultraviolet (UV), restent encore peu connus. Pourtant, certains animaux sont dotés d'une vision sensible aux UV tels que les oiseaux ou les lézards. La compréhension des mécanismes de mise en place de ces signaux au cours de l'évolution est essentielle en vue d'enrichir nos connaissances en communication animale. Le lézard vivipare (*Zootoca vivipara*) est un petit lacertidé capable de voir dans l'UV et les mâles de cette espèce arborent un patch UV sur leur gorge qui joue un rôle dans la compétition intra-sexuelle. Ce projet vise à établir la possibilité ou non d'un coût social de l'expression de la coloration UV chez les mâles de cette espèce.

Les études expérimentales que nous proposons consistent à manipuler de manière non invasive les signaux UV de lézards vivipares mâles afin de créer des individus avec des signaux malhonnêtes, c'est-à-dire ne reflétant pas leur qualité réelle. Il s'agira ainsi d'augmenter l'intensité des signaux UV d'un groupe de mâles de moins bonne qualité (i.e de petite taille) pour créer des « bluffers » (i.e UV+) et de réduire l'intensité des signaux d'un groupe de mâles de bonne qualité (i.e grande taille) pour créer des « troyens » (i.e UV-). Ces deux groupes de traitements seront accompagnés de leurs groupes contrôles respectifs (i.e non manipulés : Ctrl1, Ctrl2). En pratique, en utilisant une population captive, 30 mâles de taille moyenne non manipulés affronteront chacun, de manière successive, un mâle de chaque groupe (UV+, Ctrl1, UV-, Ctrl2) issu d'un groupe de 30 mâles captifs. Par la suite, 30 femelles issues d'une population captive et non manipulées se confronteront chacune aux mâles des quatre groupes de traitement. Ainsi, dans le cas où les signaux seraient conventionnels, nous prédisons que les femelles et mâles induiront davantage de coûts sociaux aux mâles malhonnêtes qu'à leurs contrôles respectifs. Ces coûts seront quantifiés en terme de comportements de dominance et de soumission en stoppant les interactions hyper-agressives si elles arrivent.

Le nombre d'individus prend en compte la variabilité interindividuelle des comportements des mâles et des femelles pour mener nos analyses statistiques. Il est réduit pour assurer un échantillon juste suffisant pour obtenir des résultats statistiquement solides. Les conditions d'élevage impliqueront un enrichissement des cages et des conditions climatiques correspondant au milieu naturel. Les protocoles seront raffinés par des contentions réduites en temps et des dispositions assurant la réduction du stress post-protocole via le choix de procédures non invasives et courtes. Il n'est pas possible de remplacer le modèle biologique de cette étude comportementale par un équivalent cellulaire ou in silico.

12301 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies neuromusculaires chez l'enfant. Elle est due à des mutations dans le gène de la dystrophine, une protéine jouant un rôle majeur dans la fonction et l'intégrité de la fibre musculaire. Elle est caractérisée par des atteintes musculaires progressives et graves qui entraînent une perte de la marche généralement

entre 10 et 13 ans et la nécessité d'une assistance respiratoire à partir de l'adolescence. L'atteinte du muscle cardiaque met également en jeu le pronostic vital. A ce jour, il n'existe pas de thérapie pour la DMD.

La protéine dystrophine est une protéine trop grande pour être remplacée dans son intégralité. Pour contourner ce problème, des équipes de recherche ont créé des micro-dystrophines, plus courtes mais fonctionnelles. Des études utilisant la micro-dystrophine préalablement introduite dans un vecteur viral (AAV) dans les modèles murin et canin de la DMD ont montré une restauration efficace de la protéine. Aujourd'hui des essais cliniques utilisant l'AAV micro-dystrophine sont en cours.

Cependant, des études ont montré une perte progressive des génomes viraux dans les muscles dystrophiques, associée à une perte du bénéfice thérapeutique. De plus, l'injection d'AAV induit une réponse immunitaire qui empêche toute réinjection ultérieure. Alors que les essais cliniques pour les patients DMD sont en cours, il apparaît crucial de déterminer les conditions optimales d'administration de l'AAV micro-dystrophine afin d'obtenir une efficacité maximale et pérenne dans le temps.

Le but de ce projet est de trouver des solutions pour empêcher la perte des génomes viraux. Nous étudierons le rôle protecteur d'un prétraitement pharmacologique pour optimiser le maintien des génomes AAV micro-dystrophine dans les muscles de souris dystrophiques (mdx= X-link Muscular Dystrophy). Le pré-traitement pharmacologique des animaux devrait permettre la stabilisation transitoire des fibres au moment de l'injection de l'AAV. L'objectif final étant le maintien durable du bénéfice thérapeutique induit par l'AAV micro-dystrophine.

Afin de limiter au maximum le recours à l'utilisation de souris pour l'obtention de réponses à nos questions, les expériences seront, dans la mesure du possible réalisées in vitro avec des lignées cellulaires. Ce n'est qu'en dernier recours que nous utiliserons le système murin. De même, les processus expérimentaux seront conçus de façon à utiliser un nombre de souris limité permettant une analyse statistique. (4 animaux par lot expérimental et l'expérience répétée 2 fois)

Le nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet est de 64 souris mdx.

Nos expériences visent à restaurer la dystrophine chez la souris mdx. Pour limiter la souffrance et l'anxiété, les injections en intramusculaire seront réalisées sous anesthésie gazeuse (l'isoflurane 3% en induction et 1.5% en maintien). Les souris seront ensuite conservées entre 1 et 4 mois. L'état des animaux sera évalué quotidiennement, et les souris pesées 1 fois par semaine.

Les conditions d'hébergement et l'enrichissement du milieu sont gérés par l'animalerie. Elles consistent en un contrôle quotidien des cages, un changement régulier, une gestion pour un nombre réduit d'animaux par cage (5 maximum). Le changement des cages se fait sous hotte aspirante et les cages possèdent des filtres. L'enrichissement du milieu consiste en l'ajout de laine de bois afin que les souris puissent faire un nid ainsi que de lanières de papier Kraft et des tunnels en carton. Enfin, si nécessaire, la nourriture pourra être mise à disposition sur le plancher de la cage.

12302 La cornée est un tissu composé de 3 couches. De la surface antérieure vers la postérieure, nous avons l'épithélium, ensuite le stroma et enfin l'endothélium. Cette dernière monocouche cellulaire permet de garder la cornée dans un état d'hydratation stable et ainsi garder le dioptre cornéen clair. C'est pour cela que les greffes de cornées transfixiantes (la totalité de l'épaisseur de la cornée) peuvent être supplantées dans certains cas par des greffes endothéliales dites lamellaires (uniquement la partie postérieure de la cornée : endothélium+/-un fin support stromal).

Il a été mis au point dans notre laboratoire une technique permettant de préparer : 1/ de fines lamelles de stroma cornéen humain qui ont été totalement décellularisées de leur kératocytes afin qu'elles soient constituées à 100% de collagène. Dans une précédente étude in vivo nous avons pu montrer qu'une fois implantées chez le lapin, elles ne présentaient aucun caractère toxique, et n'étaient pas rejetées par l'animal

2/ des disques d'enveloppe cristallinienne (capsule) humaine également décellularisées.

Ces 2 biomatériaux décellularisés sont utilisés comme support de culture de cellules endothéliales cornéennes afin de reconstituer « des greffons bio-ingénierés » pour réaliser des greffes d'endothéliales.

Le but de ce projet est d'étudier la tolérance et l'efficacité de ces 2 types de greffons. Aucune méthode alternative n'existe à ce jour.

Ces connaissances sont indispensables dans le processus de transfert de ce produit de bio-engineering dans un cadre thérapeutique chez l'homme.

La cornée de lapin est similaire à celle de l'homme au niveau de l'anatomie et de l'histologie.

Au total 20 lapins seront utiles pour ce projet. Ce nombre est réduit au minimum pour que les résultats soient représentatifs des variabilités inter individus.

Ce nombre doit obligatoirement être mis en œuvre afin d'être au plus proche de la situation clinique chez l'homme.

Le protocole est pensé afin de limiter au maximum le stress et la douleur de l'animal (anesthésie générale durant la pose des lamelles stromales). Un traitement antalgique systématique sera administré en post-op. Les effets indésirables possibles sont similaires à ceux de l'Homme (œdème cornéen, néovascularisation, rejet) et sont rigoureusement suivis et contrôlés dans un tableau de suivis des animaux.

Chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions, mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgésie).

Par ailleurs, les lapins sont hébergés en cage réglementaire (plateforme paroi transparente entre 2 cages), dans un environnement enrichi (divers jeux adaptés aux besoins naturels de l'espèce).

Enfin, l'eau et la nourriture (granules et foin) sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

12303 L'insuffisance cardiaque (IC) constitue une cause majeure de morbidité et de mortalité dans les pays occidentaux. La mortalité survient en raison de la dysfonction ventriculaire et des arythmies conséquentes à la sur activation du système nerveux sympathique et au remodelage cardiaque pathologique.

Plusieurs études ont démontré que Epac1 (un facteur d'échange de GTPases) est impliqué dans plusieurs pathologies telles que l'hypertrophie cardiaque, l'arythmie et que son expression est augmentée dans différents modèles animaux de cardiomyopathie ainsi que dans l'insuffisance cardiaque humaine. Ce projet visera 1) à identifier des molécules inhibitrices de Epac1 pour prévenir le développement de l'hypertrophie et 2) à identifier le rôle de Epac1 et de son homologue Epac2 au niveau du nœud sino-atrial dans la genèse et la régulation du rythme cardiaque. La découverte récente, par notre laboratoire, d'un nouvel inhibiteur de Epac1 est une opportunité afin de mieux comprendre son rôle dans les processus pathologiques permettant ainsi le développement de nouvelles thérapies. Nous avons déjà testé notre hypothèse dans des cultures primaires et souhaitons maintenant la valider dans des modèles physiopathologiques.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour l'évaluation de la fonction cardiovasculaire et ne peut être remplacée par des cultures cellulaires. De plus l'évaluation de la fonction cardiaque est à réaliser sur l'animal entier adulte afin de s'approcher le plus possible de la pathologie humaine. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe éthique des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) : (i) une planification minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude, et en conservant une puissance statistique suffisante pour observer un effet, (ii) les fonctions cardiovasculaires sont étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux, (iii) l'hypertrophie cardiaque sera induite en respectant au maximum les procédures de bien-être animal et en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques, (iv) afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés, en fin d'expérimentation

les tissus prélevés sont partagés entre les domaines explorés. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils ne subissent aucun stress.

Le nombre total de souris utilisées sera 225 sur l'ensemble de l'étude.

12304 Cette séance de travaux pratiques (TP) chez le rat est destinée à des étudiants dont la formation peut conduire à des métiers en lien avec le domaine de l'expérimentation animale. Dans ce contexte, les étudiants doivent acquérir un savoir-faire pour participer aux essais chez l'animal vigile et être en mesure de réaliser entre autres les traitements et les observations cliniques des animaux afin de pouvoir candidater sur les postes proposés par les organismes publics ou privés de recherche et par les industriels.

D'autre part, cet enseignement pratique participe à une meilleure orientation de nos étudiants par la découverte concrète des exigences et responsabilités liées à l'utilisation de l'animal.

Lors de ce TP, les étudiants réalisent une anesthésie chimique chez le rat et doivent évaluer la profondeur de l'anesthésie de leur animal à intervalles réguliers.

Les objectifs pédagogiques de ces travaux pratiques sont donc de plusieurs ordres :

- D'un point de vue pharmacologique : apprendre à reconnaître les signes cliniques permettant d'évaluer le temps d'induction d'une anesthésie, sa profondeur et sa durée d'action chez le rat.

- D'un point de vue éthique : sensibiliser les étudiants à l'importance de la surveillance d'un animal anesthésié, à la détection et à la prise en compte des signes cliniques de l'anesthésie (fréquence respiratoire, réflexes cutanés) chez l'animal.

- D'un point de vue expérimental chez l'animal : former les étudiants à la préhension / contention du rat vigile et à la réalisation d'une injection intrapéritonéale (IP) chez le rat ; apprendre à observer les animaux anesthésiés ; savoir recueillir des données expérimentales de façon exhaustive afin de répondre à l'objectif de l'étude (sensibilisation à la nécessité de préparer une étude afin d'en tirer les résultats attendus sans avoir besoin de les reproduire).

Réduction : Les étudiants seront répartis par binôme mais chaque étudiant aura la responsabilité du traitement et du suivi de son propre animal. Chaque promotion comporte au maximum 50 étudiants, avec 1 rat par étudiant. La promotion est répartie en groupes de 25 étudiants et les TP ont donc lieu sur 2 séances (1 séance par groupe d'étudiants). Chaque séance est encadrée par deux enseignants, 2 rats de démonstration (1 par enseignant) seront donc nécessaires pour chaque séance. Cinq rats supplémentaires seront également prévus chaque année en cas de soucis lors des TP (rat dont l'état de santé ne permet pas l'intégration au protocole expérimental par exemple). Ainsi $50+2+2+5=59$ rats seront nécessaires pour un an pour 50 étudiants et $59*5= 295$ rats sur 5 ans pour 250 étudiants. Ces chiffres seront évidemment revus à la baisse si le nombre d'étudiants est inférieur à 50 par promotion. Afin de réduire le nombre d'animaux, ces rats seront également réutilisés la semaine suivante dans le cadre d'un autre TP, selon les recommandations du vétérinaire référent.

Les animaux proviennent de notre propre élevage. Afin d'éviter au maximum les animaux surnuméraires, des mâles et des femelles seront indifféremment utilisés pour ces TP, tout en respectant l'attribution d'animaux d'un même sexe pour une séance.

Raffinement : Les animaux seront hébergés par groupes socialement harmonieux, en fonction de la taille de la cage et du poids des animaux, et en présence d'un enrichissement comprenant 2 éléments (tunnel en plastique noir et bâtonnet en bois à ronger ou noix). Les animaux anesthésiés seront réchauffés grâce à une lampe et leurs yeux seront protégés grâce à l'application de Viskyal.

Préalablement aux séances de TP, les animaux seront habitués à la préhension et à la contention dans le but de limiter leur stress lors de leur utilisation par les étudiants.

Remplacement : Dans le cadre de la formation de nos étudiants, le programme pédagogique national prévoit, en pharmacologie, l'évaluation in vivo des effets et du mode d'action de molécules de référence par la mise en œuvre de protocoles expérimentaux. Ce TP doit permettre d'une part d'évaluer in vivo les effets des molécules étudiées (anesthésiques) et d'autre part l'apprentissage

par nos étudiants de la technique d'administration IP chez l'animal vigile. Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de remplacement permettant une formation appropriée de nos étudiants tant sur le plan technique (manipulation de l'animal vigile, administration des substances chez l'animal vigile...) que sur le plan pharmacologique (observation des effets induits par les substances étudiées).

12305 La voie d'investigation est en lien avec les atteintes thyroïdiennes auto-immunes. L'objet du programme est de développer des anticorps chimériques humains/souris IgG1 dirigés contre le récepteur humain à la TSH (Thyroïde stimulating Hormon).

Les atteintes thyroïdiennes auto-immunes touchent de 1 à 2 % de la population caucasienne avec une prévalence plus marquée chez les femmes. Elles se caractérisent par différentes pathologies. L'une de ces maladies est la maladie de Grave dont les manifestations cliniques incluent le grossissement anormal de la thyroïde (goitre) et des thyrotoxicoses (Hyperthyroïdies). Ces atteintes sont caractérisées par l'apparition chez le malade d'une classe d'auto-Anticorps anti-TSHR stimulateurs. Mais des auto-anticorps stimulants comportant des effets différents peuvent aussi être présents associés ou non aux mêmes formes de complications. Ainsi ces auto-anticorps qualifiés de TrAbs (TSH Receptor antibodies) sont classés en 3 catégories : les TSAbs (Thyroid stimulating antibodies agonists), les TSBAbs (Thyroid stimulating blocking antibodies antagonists) ou les C-TSHR-Ab (Cleavage, neutral antibodies). Les TSAbs sont présents en très faible concentration dans le sérum des patients concernés par les atteintes thyroïdiennes mais s'accompagnent d'un effet biologique très important. Le traitement de ces indications s'est nettement amélioré au cours des 50 dernières années permettant d'en réduire les symptômes faute de soigner les patients. Cependant les traitements restent inefficaces chez près de 50% de la population avec des rechutes.

La maladie de Grave est aussi caractérisée par des complications extra-thyroïdiennes dont la plus commune est l'inflammation de la région orbitale connue sous le nom d'orbitopathie de Grave ou maladie thyroïdienne de l'œil, TED (Thyroid eye disease). La plupart des patients atteints de la maladie de Grave manifeste des TED à des niveaux de complication plus ou moins élevés. Le traitement de ces complications reste difficile, contraignant et s'appuie sur des campagnes lourdes à base de cocktails immunosuppresseurs. L'amélioration des traitements nécessite des études plus poussées sur la pathologie d'où l'importance de développer de nouveaux outils de recherche et de diagnostic.

Des modèles animaux et des protocoles expérimentaux de recherche destinés à mieux appréhender ces pathologies et leur mécanisme biologique et immunitaire ont déjà été mis en place. C'est en continuité de ses travaux que s'inscrit notre étude. Ils visent à développer des outils moléculaires permettant dans un premier temps d'analyser les effets physiopathologiques associés à la présence des différentes classes de TSAbs, puis d'en isoler des approches permettant d'améliorer le diagnostic précoce des atteintes thyroïdiennes et les traitements des différentes formes y compris les complications oculaires ou cancéreuses.

Concrètement, un modèle d'animaux transgéniques permettant de générer des IgG chimériques Humaines/Souris sera utilisé pour développer, à partir d'un protocole d'immunisation adapté à la cible et aux indications recherchées, des clones (hybridomes) sécrétant des différentes classes TrAbs. La voie de vaccination retenue nécessite l'utilisation d'une immunisation ADN du fait de l'absence de sources purifiées ou natives du récepteur au TSH et pour garantir sa bonne expression tridimensionnelle garante de la génération d'anticorps fonctionnels.

La séquence d'immunisation s'appuiera ainsi sur un protocole et des outils brevetés et validés d'un point de vue réglementaire pour l'expérimentation animale par les autorités britanniques et allemandes.

Outre les résultats scientifiques fondamentaux attendus à l'issue de cette étude le programme s'inscrit dans un projet plus vaste visant à développer des outils cliniques de diagnostic et de thérapie basés sur les anticorps qui auront été développés et caractérisés. Diverses applications sont ainsi visées comme le développement d'outils de diagnostic de la maladie de

Grave, compréhension des processus de rechute après traitement qui touchent encore près de 50% de la population et mise en place d'outils de prédiction.

Pour la réalisation de cette étude nous souhaitons disposer d'une cohorte de 25 animaux maximum pour les séquences d'immunisation, suivre la réponse immunitaire, générer et identifier les différentes classes de TrAbs et isoler les hybridomes sécréteurs de TSAbs, de TSBABs et de C-TSHR-Ab. Cette technique n'ayant jamais été utilisée sur cette lignée murine, nous allons commencer les tests sur une cohorte de 5 souris. Ces souris seront testées et euthanasiées si les résultats sont positifs.

Si la première étape de fusion issue de la meilleure souris répondeuse ne donne aucun clone hybridome viable ou spécifique, 5 nouvelles souris seront immunisées et suivront le même protocole que précédemment. Si cette nouvelle cohorte n'apporte pas de clone hybridome, 3 nouvelles cohortes de 5 animaux maximum seront immunisées.

Ces animaux seront anesthésiés par anesthésie gazeuse (2.5% d'isoflurane) lors de chaque manipulation liée à l'expérimentation. Celle-ci consiste à injecter, par voie intramusculaire, le vecteur d'ADN dans un volume inférieur à 50µL et d'électroporer celui-ci dans les cellules grâce à un système d'électroporation par ondes calibré à cet effet. Des prélèvements de sang par voie rétro-orbitale seront effectués sous anesthésie afin de tester la réponse immunitaire.

Le recours à des techniques totalement in vitro ou sur organes isolés est impossible car une réponse immunitaire spécifique pour un antigène donné doit être induite dans un environnement immunologique complet chez l'animal qu'il est impossible de reconstituer in vitro, car faisant appel à un ensemble de mécanismes génétiques, moléculaires et cellulaires mimant une réponse immunitaire humaine.

Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux en pratiquant une anesthésie gazeuse pour chaque injection ou prélèvement.

12306 L'ostéochondrose est une maladie d'origine multifactorielle fréquente des articulations (30% des poulains de selle sont affectés) qui touche les poulains jusqu'à l'âge de 18 mois. Nous savons que les lésions d'ostéochondrose évoluent entre 6 et 18 mois et qu'il existe plus de cas d'ostéochondrose lorsque les animaux ont accès à une alimentation riche en céréales et ont des concentrations sanguines d'insuline élevées. En élevage, lorsque les animaux ne peuvent pas être maintenus en pâture (par exemple l'hiver quand il n'y a pas assez d'herbe), ils sont placés en boxe individuel ou en groupe (stabulation) et sont nourris avec des fourrages et des aliments concentrés (céréales). Nous savons que le fait de distribuer l'alimentation concentrée en petits repas (repas fractionnés) permet de diminuer les pics sanguins d'insuline liés aux deux gros repas par jour distribués traditionnellement. Nous émettons donc l'hypothèse que la fragmentation de l'alimentation des poulains en 8 repas par jour au lieu de 2 ou 3 repas comme c'est le cas dans les élevages permettrait de diminuer le pourcentage de poulains présentant de l'ostéochondrose. Cet effet pourrait être dû à la réduction des pics d'insuline, mais nous savons aussi qu'il existe une relation entre le microbiote intestinal de l'animal et son métabolisme glucidique. Le microbiote intestinal pourrait être modifié par la variation de fréquence des repas et ainsi agir sur l'incidence des lésions d'ostéochondrose.

Dans ce projet, un maximum de 45 poulains mâles et femelles seront utilisés par an. Le projet se poursuivra sur trois années consécutives au maximum. Les animaux ne peuvent pas être remplacés par des modèles in vitro car nous nous intéressons au processus complet de la relation entre métabolisme et croissance ostéoarticulaire. Etant donné que les différences attendues peuvent ne pas être très importantes, le nombre de 45 poulains par an est nécessaire. Les données seront analysées chaque année, et si les résultats sont concluants après 2 ans, la troisième année ne sera pas effectuée pour satisfaire aux règles des 3R. Courant novembre, les poulains sevrés âgés

d'environ 6-8 mois seront placés dans des écuries en groupe (stabulation) comme c'est le cas en élevage traditionnel. Ils recevront des fourrages et leur alimentation sera complétée avec des céréales et un complément vitaminique en fonction de leurs besoins. Les céréales seront distribuées à l'aide d'un distributeur automatique de concentrés (DAC). Ce dispositif, utilisé en élevage, permet de reconnaître les poulains grâce à un collier autour de leur encolure et de distribuer une quantité prédéterminée de concentrés à chaque individu à un rythme préalablement décidé. Ici, durant la saison d'hivernage (de novembre à avril-mars), la moitié des animaux recevra l'aliment concentré (céréales) en deux repas journaliers alors que l'autre moitié recevra l'aliment en 8 repas répartis au cours de la journée.

Nous évaluerons l'effet de la fragmentation des repas sur les lésions ostéoarticulaire, le métabolisme glucidique et le microbiote des poulains.

Les lésions d'ostéochondrose seront évaluées par examen radiologique avant et après la période d'hivernage. Les examens radiologiques se feront avec une légère sédation (romifidine, 0,035mg/kg et butorphanol, 0,8mg/100kg) afin d'éviter que les animaux ne bougent ou ne s'affolent.

Le métabolisme du glucose sera mesuré par un test métabolique standardisé (test de tolérance au glucose durant 3 heures) nécessitant des prises de sang répétées avant l'hivernage et après l'hivernage. De plus, un seul jour au cours de l'hiver, des prises de sang seront effectuées toutes les heures entre 8 heures et 17 heures) pour mesurer la concentration en glucose et en insuline chez les animaux au cours de la journée. Pour l'ensemble de ces prises de sang répétées, un cathéter sera préalablement posé sur la veine jugulaire et les prélèvements se feront par ce cathéter (prélèvement indolore). Pour ce faire, les animaux les animaux sont tenus par une longe avec un licol placé sur la tête de l'animal dans leur environnement de vie. Le cathéter sera retiré immédiatement à la fin des prélèvements. La pose de ce cathéter réduit le nombre de piqûres et le stress des animaux, ce qui répond aux règles des 3R. Une prise de sang par mois sera aussi effectuée lors des pesées mensuelles pour déterminer les paramètres biochimiques du sang. Lors des prises de sang unique, une analgésie n'est pas effectuée car la procédure d'analgésie est au moins aussi stressante que la prise de sang elle-même. Les prises de sang sont effectuées avec des aiguilles fines, à la veine jugulaire, et n'entraînent en général aucune réaction des animaux, qui sont habitués à ces procédures classiques.

En cas de maladie de l'animal (indépendant du protocole) ou de réaction violente, la procédure est différée ou l'animal sortira du protocole en fonction de l'avis d'un vétérinaire.

Enfin, un échantillon de crottin sera prélevé directement dans le rectum de chaque poulain avant et après l'expérimentation pour l'analyse du microbiome. Cette procédure n'est pas douloureuse.

Cette étude nous permettra de conclure si l'alimentation fractionnée pendant le premier hiver chez le poulain permet de réduire l'incidence d'ostéochondrose chez le poulain ou d'améliorer l'évolution des lésions déjà constatées à 6 mois. L'analyse du métabolisme et du microbiome nous permettra de confirmer si les résultats obtenus sont bien liés au métabolisme glucidique et/ou au microbiome.

12307 Notre capacité à mesurer l'activité neuronale in vivo permet d'améliorer considérablement notre compréhension du cerveau. Le développement d'imagerie cérébrale permettant d'observer l'activité individuelle de neurones grâce à de la fluorescence est une avancée majeure. En outre, les progrès de la génétique permettent d'observer cette fluorescence uniquement chez des populations de neurones précises.

Par contre, le problème de la fluorescence est qu'elle ne peut pas traverser les tissus, ce qui empêche toute image des zones du cerveau et limite considérablement son utilisation.

Un nouvel équipement de pointe permet aujourd'hui de lever ces limitations. Il s'agit d'un système ultra miniaturisé et portable permettant de visualiser l'activité de neurone, y compris dans des zones profondes du cerveau, chez l'animal libre de ses mouvements.

L'objectif de cette saisine est la mise en place de ce système et la mise au point de deux protocoles d'enregistrement chez la souris (par transgénèse et par transfection virale). Ces protocoles, une

fois validé par ce premier projet, serviront de base à tous nos futurs projets utilisant ce système d'imagerie.

Pour cette expérimentation 72 souris (mâles et femelles) maximum seront utilisées.

Raffinement : les populations neuronales ciblées par cette méthode sont très spécifiques. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu.

Les animaux recevront un traitement analgésique avant, juste après et 24-48 suivant l'intervention, puis si nécessaire un traitement antibiotique. Chaque animal est placé sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation.

L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

Réduction : les effectifs sont optimisés

12308 Certaines espèces d'élevage (notamment les ovins) se reproduisent seulement pendant une partie de l'année (saison de reproduction) et pendant le reste de l'année sont sexuellement inactifs (contresaison) ; ces espèces sont appelées saisonnières. Le degré de saisonnalité de la reproduction des ovins diffère selon les races ; certaines races sont dites peu saisonnées (par exemple la race Ile-de-France) car la reproduction à contresaison peut être stimulée facilement, alors que chez d'autres races dites très saisonnées (par exemple Mouton Vendéen) la reproduction à contresaison est plus difficile. Un des intérêts majeurs des producteurs ovins, est de rendre possible la reproduction tout au long de l'année (pour pouvoir produire du lait ou de la viande toute l'année).

La maîtrise de la reproduction des animaux d'élevage repose principalement sur la stimulation de l'ovulation par des hormones, notamment à contresaison chez les ovins. Ces traitements sont aussi l'outil le plus efficace pour synchroniser les ovulations pour l'application de l'insémination artificielle (IA) en saison sexuelle et en contresaison. L'IA est une technologie utilisée en élevage pour accélérer la diffusion génétique dans le cadre de la sélection animale. Toutefois, ces traitements hormonaux ne répondent pas de façon satisfaisante aux attentes sociétales (absence de contaminant dans les produits consommés et de pollution de l'environnement). Des méthodes « naturelles » alternatives à l'utilisation d'hormones existent (par exemple l'effet mâle) mais ne répondent pas aux attentes des producteurs en termes d'efficacité et de rentabilité. L'un des enjeux prioritaires de la filière ovine est de rendre possible la reproduction à contresaison et de faciliter la pratique de l'IA sans utilisation d'hormone.

La kisspeptine (Kp) est un peptide neurotransmetteur (pas une hormone) qui joue un rôle clé dans la stimulation de la reproduction. Cette molécule se métabolise très rapidement dans l'organisme (dans quelques minutes) et ne peut donc pas être utilisée dans des traitements pour stimuler la reproduction car il serait nécessaire de l'administrer soit en perfusion soit nécessiterai des multiples injections, ce qui n'est pas envisageable en élevage. Ce projet concerne l'évaluation de l'efficacité d'un analogue de synthèse de la Kp (une nouvelle molécule expérimentale, non commercialisée), qui se dégrade plus lentement (dans quelques heures), pour stimuler la reproduction chez la brebis ; il s'agit d'une piste originale pour réduire voire éliminer l'utilisation d'hormones en élevage.

Cette nouvelle molécule a déjà été étudiée sur la brebis de race Ile-de-France (race peu saisonnée). Une seule injection intramusculaire, combinée ou non avec un progestagène (dérivé synthétique de la progestérone), permet d'induire des ovulations et de les synchroniser au sein d'un lot d'animaux en saison sexuelle et aussi en contresaison. Vu l'intérêt agronomique de cette découverte l'objectif de ce projet est d'étendre l'étude de l'analogue de la Kp à une race très saisonnée, la race Mouton Vendéen, afin de i) vérifier son efficacité pour induire l'ovulation et ii), dans le cas où les résultats

seraient positifs, de faire un test de fertilité pour comparer la performance de cet analogue avec celle de la méthode hormonale couramment utilisé en élevage.

Ici-bas sont indiquées les considérations et les mesures que nous avons mises en œuvre pour suivre la règle de trois R.

Remplacement : A présent il n'est pas possible de remplacer par des études in vitro l'analyse d'un phénomène aussi complexe et intégré que l'ovulation. Donc la seule solution possible est l'expérimentation sur animaux vivantes.

Réduction : Néanmoins pour réduire le nombre d'animaux nous allons utiliser les mêmes animaux pour des expériences en saison de reproduction et en contresaison. Au total nous allons utiliser 114 brebis partagé en deux lot de 47 chacun, un lot témoin et un lot traité.

Raffinement : Les prélèvements de sang sériés seront réalisés après canulation de la veine jugulaire, et non par venoponction. En outre les brebis seront hébergées en lot de façon à éviter le stress de l'isolement.

12309 Les afférences primaires transmettent les informations somatosensorielles en provenance de la peau et des tissus profonds vers la corne dorsale de la moelle épinière. Ces afférences contactent des régions spécifiques de la corne dorsale en fonction de leur modalité sensorielle: les afférences nociceptives relayant les messages nociceptifs mécaniques et thermiques se terminent dans les couches superficielles (I-II externe) tandis que celles relayant les informations tactiles non-nociceptives (Low-Threshold Mechanoreceptors, LTMRs) se terminent dans des couches plus profondes (II interne-V). Ces informations sensorielles sont alors intégrées par des circuits spinaux spécifiques et transmises aux structures supra segmentaires via des neurones de projection. L'organisation stéréotypée des afférences sensorielles primaires dans la corne dorsale ainsi que la maturation des circuits spinaux sous-tendant la somatosensation s'effectuent au cours des premiers stades postnataux et impliquent des processus de plasticité synaptique activité-dépendante. Or la maturation des circuits de la nociception s'effectue malgré la faible occurrence d'expériences douloureuses au cours des premiers stades de la vie. Ce seraient les stimuli tactiles qui contribuent au modelage des circuits de la douleur. Par ailleurs, il est aujourd'hui admis que les symptômes douloureux de patients souffrant de douleurs chroniques sont la conséquence d'une réorganisation fonctionnelle des circuits spinaux du toucher et de la douleur. En effet, si, en conditions normales, ces circuits sont fonctionnellement isolés l'un de l'autre, ils n'en sont pas moins reliés par des voies structurellement en place mais normalement masquées par des mécanismes d'inhibition. Cependant, dans certaines conditions pathologiques, cette inhibition est levée et les informations tactiles peuvent activer les circuits de la douleur pour induire des sensations douloureuses.

Il semble donc que les circuits du toucher jouent un rôle clé dans la maturation des circuits de la nociception au cours du développement, ainsi que dans l'induction de certains symptômes douloureux. Cependant, le lien entre activité des afférences tactiles et plasticité fonctionnelle au sein de la corne dorsale, aussi bien en conditions normales que pathologiques, reste à établir précisément. De plus, il n'est pas sûr que les différents sous-types de LTMRs (A delta, A bêta et C) soient tous impliqués dans ces processus. Jusqu'à récemment, un des obstacles pour aborder ces questions résidait dans la relative faible spécificité des approches pharmacologiques et dans la difficulté à manipuler des populations précises de LTMRs.

Nous proposons ici d'utiliser des modèles innovants de souris transgéniques permettant de manipuler spécifiquement des sous-types de LTMRs, soit en les éliminant soit en modulant leur activité électrique, et d'en étudier les conséquences sûres : i) la maturation des circuits de la nociception en conditions normales et ii) le développement de douleurs chroniques dans des modèles animaux. Ces études seront réalisées en combinant des approches immunohistologiques, électrophysiologiques et comportementales. Plus généralement, ce projet permettra de mieux connaître la mise en place des circuits spinaux de la somatosensation et leur plasticité en conditions physiopathologiques à la base des douleurs chroniques.

Pour ce projet, l'utilisation de souris transgéniques permettant de cibler spécifiquement les fibres LTMRs est nécessaire. Aucune méthode alternative n'existe pour prévenir l'utilisation de ces

animaux dans ce protocole : en effet, il est nécessaire de réaliser ces études chez l'animal car l'intégration du toucher et de la douleur implique de nombreux neurones organisés en réseaux complexes et méconnus du système nerveux central et périphérique. Au total, 610 souris seront utilisées dans ce projet (voir description du projet) L'ablation sélective des fibres LTMRs sera induite par injection intrapéritonéale de toxine diphtérique (DT). L'inhibition sélective de ces fibres se fera par injection intrapéritonéale de clozapine N-oxide (CNO). L'ablation ou l'inhibition sélective des fibres LTMRs est soumise à des variabilités interindividuelles. De ce fait, il sera nécessaire d'analyser post mortem le tissu nerveux de chacun des animaux utilisés dans ce protocole. Par conséquent, l'euthanasie de l'animal à la fin du protocole expérimental est nécessaire. Afin de respecter la règle des 3R, le nombre de souris par groupe est réduit au maximum tout en permettant de discriminer un effet significatif entre les conditions expérimentales et calculé par tests statistiques adaptés. Les groupes testés seront des animaux contrôles ou des animaux douloureux chroniques (induit par constriction nerveuse chronique ou CCI) pour induire une douleur neuropathique. Le modèle CCI mime la constriction chronique nerveuse observées chez de nombreux patients neuropathiques atteints de lésions nerveuses et qui est responsable d'une hypersensibilité dans le, et autour du, territoire lésé. Pour ce modèle de douleur, chaque animal est son propre contrôle (avant versus après induction de la douleur neuropathique) ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés tout en conservant un contrôle et une qualité suffisante à l'expérimentation. Chaque animal sera testé à l'aide d'une série de stimulations mécaniques qui contribue au respect des "R" réduire et raffiner. Nous utiliserons un nombre équivalent d'animaux mâles et femelles en respect de la règle des trois "R" et des directives sur la Recherche Animale.

Ce projet porte sur le toucher et la douleur. Par conséquent, l'utilisation d'antalgiques suite à l'induction de l'ablation des fibres LTMRs ou de l'établissement du modèle de douleur est proscrit. Cependant, en respect de la règle des trois "R", les animaux seront hébergés en milieu enrichi (social et environnemental) afin de respecter au mieux leur confort et leur niveau de stress. Aucun des modèles de douleurs décrits dans ce projet n'induit de déficit locomoteur sévère pouvant influencer sur les besoins physiologiques de l'animal. De plus, l'expérimentation sera arrêtée si l'animal montre une perte de poids supérieure à 15% suite à un traitement. Enfin, les tests comportementaux à la douleur seront réduits au minimum (fréquence et intensité des tests) et réalisés selon des protocoles expérimentaux établis et acceptés par la communauté scientifique.

12310 Malgré des progrès importants dans la compréhension de la physiopathologie des thromboses artérielles, les maladies ischémiques (infarctus du myocarde, la plupart des accidents vasculaires cérébraux et les artériopathies périphériques invalidantes) restent la première cause de morbi-mortalité dans les pays développés. Les plaquettes, qui sont des petites cellules du sang, ont un rôle majeur dans la survenue des thromboses artérielles, par leur capacité à former des agrégats qui bouchent les artères. Le traitement des maladies ischémiques consiste principalement à administrer des médicaments qui inhibent l'agrégation des plaquettes et ainsi les thromboses. Cependant, des progrès restent à faire pour obtenir des traitements plus efficaces.

L'un des médicaments les plus prescrits pour son activité anti-thrombotique est le clopidogrel. Ce médicament inhibe le récepteur P2Y₁₂ de l'ADP, qui joue un rôle central dans l'activation des plaquettes et la formation des thromboses. On a longtemps pensé que l'expression du récepteur P2Y₁₂ était restreinte aux plaquettes. Cependant, des données récentes indiquent que ce récepteur est également exprimé sur d'autres types de cellules, telles que les globules blancs et les cellules musculaires de la paroi des artères, qui pourraient influencer sur la thrombose. Ceci suggère que le clopidogrel pourrait inhiber, non seulement les récepteurs P2Y₁₂ plaquettaires, mais également ceux présents sur d'autres espèces cellulaires et ainsi d'influer sur son activité antithrombotique.

La thrombose est un processus intégré qui fait intervenir de multiples acteurs cellulaires (cellules sanguines -plaquettes, leucocytes-, paroi vasculaire), les protéines plasmatiques et le flux sanguin. Les modèles *in vitro* ne sont pas assez sophistiqués pour appréhender toute la complexité générée par ces phénomènes intégrés. Ainsi, il est nécessaire de recourir à un modèle animal permettant de modéliser au plus proche les caractéristiques de la pathologie humaine et ainsi comprendre les mécanismes mis en jeu.

Notre objectif est de comparer l'effet antithrombotique du clopidogrel à celui dû à l'absence du récepteur P2Y12 spécifiquement des plaquettes sanguines chez la souris. Cette évaluation sera réalisée dans différents modèles de thrombose chez la souris. Ces modèles, qui diffèrent par les mécanismes leur mode d'induction et les mécanismes d'activation des plaquettes, permettent de couvrir les situations pathologiques différentes, rencontrées chez l'homme.

Ces travaux permettront d'une part, de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de la thrombose et, d'autre part, de déterminer la spécificité d'action du clopidogrel, dans la perspective in fine d'améliorer l'efficacité et la spécificité des traitements antithrombotiques.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés. Ces nombres d'animaux ont été déterminés de façon à obtenir des résultats statistiquement significatifs. Une analyse de variances de type ANOVA avec un post-test Bonferroni sera réalisée entre les groupes.

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure de papier pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture.

Des points limites prédictifs ont été établis permettant d'interrompre les procédures limitant ainsi la souffrance animale.

Toutes les expériences de thrombose seront réalisées sur des animaux anesthésiés. Elles ont une durée maximale de 40 min. Les animaux sont ensuite mis à mort avant leur réveil.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont pris en charge par du personnel compétant et entraîné.

Remplacer : Le recours à l'utilisation d'animaux est justifié par le fait que les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régissent la thrombose sont difficiles, voire impossible à étudier chez l'homme, vue l'imprévisibilité de l'évènement. Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront réduites au minimum et complétées par des études in vitro sur cellules (tests d'activation cellulaire).

L'ensemble de ces expériences nécessitera au maximum 600 souris.

12311 L'Arthrose est une maladie articulaire chronique très invalidante et douloureuse conduisant à la destruction du cartilage. Il ne s'agit pas d'usure mais bien d'un syndrome destructeur qui est associé à un contexte inflammatoire qui touche non seulement le cartilage, mais qui s'étend également aux autres structures de l'articulation (os, synovie). Plusieurs formes d'arthrose prédominent selon l'âge, l'instabilité mécanique, l'obésité ou un traumatisme articulaire.

Cette pathologie, dans son ensemble, constitue une des formes les plus courantes de maladie musculosquelettique avec dans le monde, en 2016, 250 millions de patients atteints, un nombre qui devrait doubler d'ici 2035. Elle reste la première cause de handicap chez les personnes de plus de 40 ans et est responsable d'une part importante des arrêts de travail.

Problème majeur de santé publique, l'arthrose ne peut toujours pas être soignée. Hormis les traitements symptomatiques de la douleur (antalgiques) et de l'inflammation (anti-inflammatoires), il n'existe aucun moyen d'en guérir ou de prévenir son installation chez un individu à risque.

Nous avons récemment démontré que les rats de la souche SHHF porteurs d'une mutation dans le récepteur de la leptine (SHHFcp/cp) souffrant d'un syndrome métabolique ou SMet caractérisé par une obésité, une insulino-résistance, une hyperglycémie, une hypertension et une dyslipidémie, développe des lésions arthrosiques sévères à 12,5 mois de vie alors que leur contrôle appelé SHHF+/+ ne développe ni un SMet ni une arthrose à ce même âge. En utilisant ce modèle unique d'arthrose métabolique nous avons pu démontrer qu'un traitement préventif avec une molécule aux effets bénéfiques sur le SMet pouvait également empêcher l'apparition d'une arthrose métabolique dans ces conditions. Bien que prometteur, ces résultats demandent à être validés en démontrant que cette molécule qui dispose déjà d'une autorisation de mise sur le marché (AMM), peut également avoir des propriétés curatives et ainsi apporter pour la première fois la possibilité d'avoir à disposition un médicament pour des personnes atteintes d'une arthrose métabolique.

Pour réaliser cette étude, nous devons 1) caractériser la cinétique d'apparition de l'arthrose dans notre modèle de rats SHHF afin de trouver les stades débutants de l'arthrose, 2) utiliser cette information pour traiter avec notre molécule ou un placebo des rats avec une arthrose débutante, et 3) tester si les effets bénéfiques de la molécule peuvent également être retrouvés dans une arthrose d'éthologie différente à savoir une arthrose traumatique induite par chirurgie.

Pour cela, 175 rats de la souche SHHF répartis en 35 SHHF+/+ et 70 SHHF+/cp minces sans Smet et 70 rats SHHFcp/cp obèses avec Smet séparés en 2 lots eux même séparés en sous-groupe seront utilisés dans cette étude:

Lot 1 (4 semaines de vie) de 15 rats SHHF+/+, et 30 rats SHHFcp/cp pour étudier la cinétique d'apparition de l'arthrose métabolique et de 30 rats SHHF+/cp pour celle de l'arthrose traumatique

Lot 2 (4 semaines de vie) de 20 rats SHHF+/+, et 40 rats SHHFcp/cp pour le traitement curatif de l'arthrose métabolique et 40 rats SHHF+/cp pour le traitement curatif de l'arthrose traumatique

Remplacement : l'animal est indispensable car les effets à observer touchent plusieurs sites articulaires et ont des implications sur de nombreux organes.

Réduction : basé sur nos études précédentes, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum tout en conservant la puissance statistique nécessaire et suffisante pour répondre rigoureusement aux questions posées.

Raffinement : une surveillance quotidienne (prise de poids) et les points limites (perte de poids de 20% sur une semaine chez SHHF non obèses ou arrêt de gain de poids sur une semaine chez les obèses ; boiterie ou difficulté à se mouvoir) ont été déterminées pour s'assurer de l'absence de douleur des procédures légères et modérés (anesthésie, traitement antalgique post chirurgical).

Les animaux seront mis à 3 par cages de 900 cm² puis transférés à 3 dans des cages de 1500 cm² dès qu'ils auront atteint le poids de 300 g. Toutes les cages seront enrichies avec des bûchettes en peuplier avec un tunnel en carton ou en polycarbonate.

12312 Une basse pression partielle en oxygène (l'hypoxie), est la condition commune à toutes les tumeurs solides et niches des cancers leucémiques. L'hypoxie est la condition qui sélectionne et maintient les cellules souches cancéreuses. Il est donc indispensable d'avoir un moyen de compenser de manière stable cette condition hypoxique. Des molécules ont été conçues pour permettre de modifier suffisamment les propriétés de l'hémoglobine pour qu'elle délivre plus facilement le dioxygène dans le sang. Le but de l'expérience est de démontrer la validité des mécanismes d'action de la molécule myo-inositol trispyrophosphate (ITPP) ainsi que de son analogue BPBPP. En conséquence, un traitement du sang par ces molécules faciliterait la libération de l'oxygène permettant de rétablir une oxygénation physiologique. Ce projet permettra de répondre à plusieurs questions : (1) l'influence de l'injection des molécules sur la l'hypoxie tumorale (2) Le traitement répété de manière appropriée, permet de rendre fonctionnels (normalisés) les vaisseaux précédemment pathologiques, enfin (3) De suivre l'évolution de la tumeur au fur et à mesure de l'application du protocole de traitement. (4) La synergie entre les deux molécules permet-elle une meilleure oxygénation de la tumeur.

Le modèle tumoral que nous utiliserons est la tumeur mammaire orthotopique de souris.

Le projet se déroule en deux étapes :

- L'étape 1 consiste à implanter les tumeurs dans la glande mammaire de la souris.
- L'étape 2 consiste à imager la tumeur et à injecter les molécules pour évaluer leur effet sur l'hypoxie tumorale et la croissance tumorale.

Les dommages que les souris pourront rencontrer sont liés à la gêne possible due à la croissance tumorale. Des point limites adaptés seront mis en place. Un antalgique sera administré en cas de douleur.

Ce projet sera mené conformément à la règle des 3R : l'ensemble des procédures seront réalisées sur animaux anesthésiés (raffiner). Le nombre d'animaux sera réduit si les résultats escomptés sont obtenus avant la réalisation de l'ensemble des procédures. De plus l'imagerie échographique non invasive permet de suivre l'efficacité d'un traitement sur le même animal (réduire). Le

développement de modèles animaux reste nécessaire car il n'existe pas aujourd'hui de modèles représentatifs de la complexité d'un organisme entier sain ou pathologique (remplacer).

Ce projet utilisera un total de 70 souris.

12313 L'esturgeon européen fait l'objet d'un plan de restauration au niveau national et européen. Dans ce cadre, un stock captif issu des derniers individus sauvages et des premières reproductions assistées a été constitué afin de permettre des repeuplements en milieu naturel.

Actuellement le stock se trouve dans une phase où les femelles issues des reproductions assistées sont trop jeunes pour être mûres. Cependant les premiers mâles issus des reproductions assistées sont en âge de se reproduire et de la semence doit être récoltée pour alimenter la banque de sperme en vue d'optimiser les croisements génétiques des prochaines reproductions.

Il n'est pas possible dans cette opération d'appliquer la règle du remplacement, puisque l'objet est de restaurer l'espèce cible, l'esturgeon européen.

Les manipulations consistent en capturer grâce à l'intervention d'un plongeur professionnel les mâles, réaliser des échographies et prises de sang pour valider le stade de maturation des gonades. Si le poisson est sélectionné pour participer à la reproduction il est transféré à l'aide d'un chariot équipé d'une cuve en eau dans des bassins spécifiques de 15m³ d'eau. Ils seront ensuite prélevés 15 jours plus tard, afin de subir un nouveau contrôle de la maturation par échographie et prise de sang. Une injection d'hormone est réalisée pour finaliser la maturation, ce qui permet de prélever le sperme 30 à 32h plus tard. Les individus sont ensuite remis dans leur bassin d'élevage d'origine. En fonction des années, et des degrés de maturation des individus, 100 poissons pourront être utilisés sur toute la période du projet.

Toutes les manipulations seront mises en place afin de réduire au maximum le stress des poissons. Ainsi la plupart des manipulations lorsque le poisson n'est pas anesthésié se fera dans l'eau afin de minimiser le stress. Le moment idéal d'injection d'hormone est identifié grâce à des suivis mis en place spécifiquement (échographies des individus, prise de sang et suivi de la maturation grâce aux analyses de sang réalisées et biopsies des organes reproducteurs). Ces manipulations sont réalisées un nombre minime de fois et dans des conditions de diminution du stress des poissons. Les poissons sont sédatés pour la plupart des manipulations (pesée, échographie, injection d'hormone...).

Une fois les prélèvements réalisés, les poissons retournent dans leur bassin de repos et un suivi de l'état est mis en place. Un suivi par écho-doppler est réalisé dès que le poisson est sorti de l'eau afin de suivre le rythme cardiaque et pouvoir stopper la manipulation si des signes de stress sont observés (augmentation du rythme cardiaque ou baisse). Si dans le bassin de repos, le poisson montre des signes de stress, de fatigue (animal prostré, ne nage pas, hyperventilation, rougeur) cela indiquera que nous avons atteint le point limite de la manipulation et le poisson retournera dans le stock et ne subira pas d'injection.

Afin d'aider les mâles, des compléments vitaminiques seront distribués avant et après la période de reproduction en cure de 15 jours.

Chaque poisson est identifié individuellement par numéro pit-tag, ce qui permet de ne pas confondre les individus et de n'injecter qu'une fois chaque poisson. Les individus sont sélectionnés en fonction de leur génétique, et seul le sperme des individus dont nous ne possédons pas de sperme en quantité suffisante dans la banque de sperme sera prélevé. Cela permet de réduire au maximum le nombre d'individus utilisés tous les ans (Règle des 3R).

12314 Le syndrome de Hutchinson-Gilford (HGPS), ou Progeria, est une maladie génétique rare conduisant à un vieillissement prématuré. Les enfants atteints par cette pathologie présentent de sévères atteintes du système cardiovasculaire responsables d'une mortalité précoce (par infarctus du myocarde ou accident vasculaire) vers l'âge de 13.5 ans. Cette pathologie est due à une mutation hétérozygote du gène LMNA conduisant à la production d'une protéine toxique nommée la Progerine. A l'heure actuelle, aucun traitement n'est disponible pour traiter les patients.

Des recherches réalisées in vitro sur des cellules provenant de patients HGPS ont montré que la molécule PGL207 diminuait la quantité de Progérine dans ces cellules à des doses n'ayant pas d'effet cytotoxique. Cette molécule, utilisée comme traitement anti cancer, a déjà été étudiée chez la souris et ses caractéristiques pharmacocinétiques et toxicologiques sont connues. Elle dispose d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour une formulation disponible par voie orale.

L'objectif de ce projet est de réaliser une étude pilote de l'effet in vivo de cette molécule sur un modèle murin de Progéria disponible dans notre établissement utilisateur. Pour cela, 24 animaux seront utilisés dans diverses procédures :

- Le maintien de la lignée : en effet, notre modèle murin qui présente des signes cliniques proches de ceux des patients (retard de croissance, mortalité prématurée avant l'âge de 6 mois, anomalies squelettiques, cutanées et cardiaques) est considéré comme un modèle génétiquement modifié avec un phénotype dommageable.

- Le traitement par voie orale : 12 animaux seront traités par voie orale avec le traitement à des doses inférieures aux doses maximales tolérées rapportées dans le dossier EMA (European Medicines Agency) et les différentes publications utilisant la molécule dans des modèles murins. Le traitement débutera sur des animaux âgés de 1 mois. L'induction du traitement se fera par deux administrations au cours de la première semaine puis les animaux seront traités de manière hebdomadaire pendant 3 (6 animaux) ou 7 semaines (6 animaux). En parallèle à ces groupes, 12 animaux contrôle seront traités avec un placebo (solution véhicule)

- Les prélèvements sanguins et tissulaires: les 24 animaux issus des procédures 1 et 2 seront soumis à cette procédure. A l'issue des traitements, les souris seront anesthésiées par isoflurane et une ponction sanguine intracardiaque terminale sera réalisée. Avant leur réveil, les souris seront mises à mort et leurs seront ensuite prélevés pour réaliser des tests d'efficacité à l'échelle moléculaire et histologique.

Cette étude sera réalisée dans un établissement utilisateur agréé et les souris seront manipulées et suivies par du personnel compétent. Les animaux seront hébergés dans des salles dont les paramètres d'ambiance sont contrôlés (température : 22-24°C ; renouvellement d'air : 15 fois/heure ; éclairage artificiel : 12h jour/12h nuit). Afin de respecter leur instinct grégaire, les souris seront stabulées par petits groupes de 3 à 5 dans des cages dont l'environnement est enrichi à l'aide de maisonnettes en carton. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne afin de détecter précocement les points limites de souffrance.

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

- Remplacer : notre projet se fera dans la continuité d'une étude in vitro. Le passage au modèle in vivo est une étape indispensable avant d'envisager un essai thérapeutique chez l'homme.

- Réduire : cette étude est une étude pilote permettant de valider l'hypothèse d'efficacité in vivo d'une molécule. Le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour mettre en évidence une modification significative des biomarqueurs qui seront suivis.

- Raffiner : afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture ad libitum, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Des points limites clairs seront définis et les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils atteindront les critères d'interruption.

12315 Dans le cadre d'un projet visant à étudier la croissance de deux lots de veaux Holstein soumis à des régimes nutritionnels différenciés, nous souhaitons utiliser les techniques d'imagerie non destructives tomographie rayons X et IRM comme techniques de référence en comparaison des mesures morphométriques et échographiques qui auront lieu en élevage. Les objectifs des examens tomographiques seront la mesure de la densité osseuse, la détermination de la masse adipeuse et musculaire globale, la mesure des épaisseurs de tissus adipeux et musculaires en des points anatomiques précis correspondant aux examens échographiques. Les objectifs des examens IRM seront la mesure du volume du parenchyme mammaire, le suivi qualitatif et quantitatif du développement des pré-estomacs (réseau et rumen), la détermination de la masse adipeuse et musculaire globale. Ces deux techniques étant basées sur des principes physiques différents, les

deux approches seront envisagées dans un premier temps, l'une des deux pourra être abandonnée à l'issue des examens préliminaires.

Réduction : Cette étude préliminaire et descriptive concernant 4 veaux femelles a pour but d'optimiser les examens d'imagerie qui pourront être envisagés sur un nombre plus importants d'animaux lors d'une expérimentation ultérieure.

Raffinement : Les génisses laitières utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance quotidienne, hébergées ensemble en aire paillée et nourries suivant un plan de lactation / nutrition précis nécessitant une surveillance bi-quotidienne.

Pendant toute la durée de l'expérimentation, les animaux ont accès à de la paille fraîche (distribuée quotidiennement) et à de l'eau de façon ad libitum.

Les examens auront lieu sur des veaux âgés de 12 semaines pour éviter de perturber les animaux pendant la période critique qui suit immédiatement le sevrage à 9 semaines.

Les animaux subiront un examen tomodensitométrique de courte durée dans un premier temps (de l'ordre de 15 minutes) puis un examen IRM (limité à 1 heure) afin de limiter les perturbations de la durée de l'anesthésie sur les animaux.

Le réveil des animaux aura lieu au calme dans une case capitonnée, dans une salle chauffée. Après le réveil effectif, le veau sera ramené dans son box à l'élevage.

Remplacement : Très peu de données sont disponibles aujourd'hui sur la variation des indicateurs phénotypiques permettant de suivre la croissance des veaux de la naissance à la puberté. De plus, il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle mathématique prédictif qui nous permettrait de suivre la croissance des veaux, cette expérimentation ne peut donc pas être remplacée.

12316 La maîtrise de la maturation sexuelle et de la fertilité des géniteurs est un enjeu important pour la filière piscicole. Chez les mâles, l'émission de millions de spermatozoïdes féconds peut être obtenue quotidiennement grâce au recrutement permanent des cellules souches germinales qui sont capables de se renouveler ou de se différencier progressivement pour initier la spermatogenèse. Les mécanismes impliqués dans l'initiation de la spermatogenèse sont encore mal connus chez les poissons. Le projet proposé vise à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'initiation et le déroulement de la spermatogenèse en utilisant des conditions physiopathologiques induites par le vieillissement qui perturbent son déroulement ou la bloquent. Nous avons observé une hypertrophie non tumorale des testicules avec un poids et un volume des gonades qui augmentent fortement au cours du vieillissement des poissons zèbres mâles adultes qui deviennent stériles. Pour comprendre ce processus physiopathologique, nous suivrons le déroulement de la spermatogenèse au cours de la croissance des individus de 12 à 36 mois. Nous prélèverons les gonades pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents non seulement grâce à de nombreux gènes candidats déjà identifiés au laboratoire comme étant impliqués dans certaines étapes de la spermatogénèse mais aussi grâce à de nouvelles études transcriptomiques sans a priori. Notre étude devrait aussi permettre à terme de comprendre de nombreux cas d'infertilités masculines idiopathiques chez l'homme.

L'étude tiendra compte de la règle des 3R :

Remplacer : il n'existe pas de modèle de spermatogenèse in vitro chez le poisson zèbre. Elle ne peut être étudiée que in vivo.

Réduction : Le nombre de poissons utilisés dans cette étude (280 individus adultes) est nécessaire et suffisant pour répondre aux exigences statistiques des approches moléculaires qui seront mises en œuvre

Raffiner. Le comportement des animaux sera suivi de manière à s'assurer que les poissons vieillissant n'aient pas de comportement de nage anormal et qu'ils se nourrissent normalement. Les poissons seront euthanasiés selon les règles en vigueur avant le prélèvement des gonades.

12317 Le projet a pour objectif la conception et la validation de nouveaux agents de contraste pour le diagnostic précoce du diabète type 2 par imagerie médicale. Il est estimé que 439 millions d'adultes

seront atteints par cette maladie en 2030, dont 90 % avec diabète type 2, ou diabète non insulino-dépendant. Des études chez des patients atteints de diabète type 2 ont montré la présence de dépôts amyloïdes dans les îlots pancréatiques. Ces dépôts essentiellement formés d'amyline, constituent une bonne cible pour la détection précoce de diabète type 2.

L'IRM est une technique qui est maintenant reconnue et largement utilisée en routine clinique. C'est une méthode qui utilise des champs magnétiques et qui n'utilise ni rayons X ni rayonnement ionisants. Elle est non invasive et non traumatique. L'utilisation des agents de contraste permet d'améliorer les contrastes entre les tissus en particulier là où ils se fixent.

Nous avons conçu de nouveaux agents de contraste IRM qui ciblent spécifiquement les agrégats d'amyline, et qui peuvent ainsi permettre la détection précoce du diabète type 2 par une méthode d'imagerie non-invasive. Le but de ce projet est d'étudier la biodistribution par IRM in vivo de ces agents de contraste une fois injectés chez la souris.

Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale:

- Remplacement: le modèle animal souris est fondamental dans notre cas, puisque l'étude préclinique en particulier ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.
- Raffinement: Aucune douleur ne sera ressentie par l'animal puisque l'IRM est totalement indolore et réalisé sous anesthésie. Ce projet concerne une procédure courte d'imagerie sans réveil. Enfin, l'injection IV de l'agent de contraste n'est pas plus douloureuse qu'une piqûre d'aiguille. Chez l'homme aucune analgésie n'est donnée pour l'injection d'un agent de contraste.
- Réduction: le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles.

L'intérêt de l'IRM réside aussi dans le fait qu'une même souris peut être observée longitudinalement. Dans notre étude 100 souris seront utilisées.

12318 La vaccination est un procédé consistant à introduire un agent extérieur (le vaccin) dans un organisme vivant afin de créer une réaction immunitaire positive contre une maladie infectieuse. La substance active d'un vaccin est un antigène dont la pathogénicité est atténuée afin de stimuler les défenses naturelles de l'organisme (le système immunitaire). Afin d'améliorer la réponse immunitaire contre l'antigène d'intérêt, des composés dénommés adjuvants sont ajoutés. Notre société est spécialisée dans le domaine de l'immunité innée et commercialise un grand nombre de réactifs de laboratoire destinés à la vaccination, notamment des adjuvants de vaccination. Au sein du département R&D, nous avons développé de nouveaux ligands agonistes de récepteurs de l'immunité innée. Après criblage in vitro, nous avons sélectionné des molécules candidates qui potentiellement peuvent être d'excellent adjuvant vaccinal. Ce projet a donc pour but de tester ces différentes molécules et mélanges de molécules en tant qu'adjuvant de vaccin. Concrètement, ces molécules seront mélangées à un antigène puis injectées localement à des animaux, afin d'étudier la réponse immunitaire contre l'antigène. Nous avons choisi l'antigène modèle (ovalbumine) car c'est un modèle expérimental simple et maîtrisé qui nous permet d'obtenir avec un nombre restreint d'animaux des données fiables (dans une volonté d'application de la règle des 3R).

La douleur, pouvant résulter de la mise en œuvre de certaines procédures opératoires (en particulier l'injection des solutions contenant l'antigène d'intérêt avec les molécules adjuvantes), est prise en charge, dans nos protocoles, par la combinaison de l'anesthésie gazeuse (molécule aux propriétés sédatives, narcotiques ; analgésiant ; myorelaxant) avec l'administration d'analgésiques en pré- et post-opératoire. D'autre part, afin de réduire tout stress ou détresse infligés aux animaux pendant l'expérimentation, nous mettons en œuvre des soins « per-opératoire » : vérification de la profondeur d'anesthésie (réflexe de retrait de la patte), surveillance de la fréquence respiratoire (couleur des muqueuses, pattes), utilisation de tapis chauffant durant toute l'anesthésie ; utilisation de gel oculaire protecteur durant l'anesthésie (ayant pour but de limiter le dessèchement oculaire afin de préserver l'intégrité de la cornée des animaux anesthésiés). L'ensemble de ces procédures sont des mesures de raffinement et contribuent au bien-être de l'animal tout le long de

l'expérimentation ainsi qu'à améliorer la qualité des résultats (éviter des données incorrectes obtenues à partir d'animaux souffrants ou stressés).

Ces études nous permettront de déterminer l'intérêt de ces molécules adjuvantes pour la vaccination animale et potentiellement humaine.

L'ensemble de ce projet nécessitera 2400 souris et 200 rats sur une période de 5 ans. Les procédures sont réalisées par du personnel qualifié et habilité dans le cadre de la réglementation en vigueur.

12319 L'alimentation des ruminants est une des principales clefs de réussite de leur élevage. Clef technique, pour réaliser les objectifs de production de l'éleveur, clef économique puisque c'est une des principales charges des élevages. Il importe donc de pouvoir optimiser les aliments utilisés et/ou produits sur l'exploitation pour nourrir les animaux de la dite exploitation.

La connaissance la plus précise possible de la valeur alimentaire de ces aliments, fourrages notamment, est donc un facteur de réussite technique et économique des élevages de ruminants.

Dans ce projet, il s'agit de mesurer la valeur alimentaire des aliments. La mesure est faite à partir de moutons de race Texel.

Cette méthode sert de référence pour les fourrages de qualité très variable (à base d'herbe) ou peu connus. Elles servent de référence pour caler/calibrer les méthodes de prédiction de la valeur alimentaire à partir d'analyses chimiques ou infra-rouge.

A partir de la quantité d'aliment ingérée par les moutons et des fèces produits par le mouton, nous calculons la valeur énergétique et protéique ainsi que l'ingestibilité des aliments pouvant être ingérés par des ruminants. Les résultats sont extrapolables aux autres espèces de ruminants.

Un aliment est caractérisé à partir d'un lot de 6 moutons nourris sur celui-ci, plus 2 moutons supplémentaires au cas où il faudrait en remplacer un. Pour avoir la possibilité de mesurer simultanément 2 aliments, il faut donc 16 moutons présents en même temps (en stalle ou en bergerie ou au pré). Les moutons sont renouvelés tous les 1 à 2 ans (selon le dépassement du poids vif de 70 Kg). Cela représente donc un effectif de 60 moutons sur 5 ans.

Notre atelier est complémentaire des dispositifs qui travaillent sur la valeur des aliments destinés aux animaux de rente.

La règle des 3R a été prise en compte :

- remplacement : pour certains fourrages variables, il n'est pas possible d'utiliser les méthodes de laboratoire. Le recours aux moutons est indispensable. Par contre pour les fourrages stables, on utilise des analyses en laboratoire.

- réduire : le nombre d'animaux utilisés et la durée de mesure sont issus d'un compromis pour avoir une puissance statistique suffisante.

- raffiner : tout animal qui présente des signes d'inconfort sur la période de mesure est sorti de l'essai.

12320 Le développement et le fonctionnement du système nerveux dépendent du maintien de l'intégrité du génome. D'une part, de nombreux troubles neurologiques humains d'origine génétique résultent d'une signalisation et d'une réparation défectueuse de l'ADN (syndrome de Cockayne, ataxie télangiectasie...). D'autre part, le cerveau humain peut être exposé à de nombreux agents endommageant l'ADN, tels que les polluants, et à des rayonnements ionisants (utilisations médicales pour le diagnostic ou les traitements de tumeurs, accidents nucléaires). Il est établi que les rayonnements ionisants à des doses supérieures à 100-200 mGy peuvent induire de nombreuses pathologies cérébrales quand l'irradiation a lieu pendant la formation du système nerveux central, telles que la microcéphalie et des troubles intellectuels ou cognitifs.

Notre projet s'intéresse à la caractérisation à l'âge adulte des conséquences délétères à long terme d'irradiations ionisantes modérées (100 - 1000 mGy) in utero ou après la naissance, phases les plus radiosensibles du développement cérébral. Nous utilisons pour cela l'imagerie par résonance magnétique (IRM) chez des souris normales ou déficientes pour le système NHEJ de réparation de

l'ADN. Afin de mieux appréhender les mécanismes biologiques sous-jacents aux effets neurologiques radio-induits, des tests comportementaux et des analyses immunohistologiques compléteront notre étude. Les données IRM seront acquises à l'aide d'un scanner IRM à 11,7 Tesla. En raison de l'aspect dynamique des réponses des niches neurogéniques (neurotransmetteurs, facteurs de croissances, hormones...) à leur environnement biochimique immédiat, il est nécessaire d'évaluer ces effets sur un organisme intégré. Notre étude, conçue avec la volonté de respecter les règles éthiques, vise à réduire le nombre d'animaux (maximum 339 rongeurs nés et élevés en captivité, issus d'un établissement autorisé) en utilisant l'IRM, une technique d'imagerie non-invasive garantissant des données de qualité en un temps raisonnable. Après une étude pilote qui permettra d'affiner notre protocole, la caractérisation de ces différents modèles d'irradiation et de leurs conséquences neuropathologiques nous permettra de valider nos biomarqueurs IRM des lésions cérébrales radio-induites. Elle ouvrira la voie à une prise en charge non-invasive de patients exposés de manière accidentelle ou dans un cadre thérapeutique à de faibles doses de radiations. Le projet dans sa globalité est classé au degré de sévérité légère. En effet, l'irradiation est réalisée chez l'animal vigile sans contraintes et toute autre intervention sur les animaux est réalisée sous anesthésie, à l'aide de méthodes peu invasives. Les protocoles d'anesthésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Une visite quotidienne des animaux sera effectuée pour s'assurer du bien-être des animaux avec la mise en place et l'application de critères d'arrêts tout au long de l'étude. Dans le cas d'effet inattendu, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou de décider de l'euthanasie. Le projet a été soumis au comité d'éthique et l'ensemble de ses recommandations seront mises en œuvre.

12321 L'objectif de ce projet s'inscrit dans l'évaluation d'approches de thérapie génique médiée par des vecteurs viraux pour des maladies génétiques rares du muscle, les dystrophies musculaires, pour lesquelles il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement.

Les vecteurs de thérapie génique qui seront évalués au cours de ce projet ont déjà été préalablement sélectionnés parmi d'autres qui varient par la cassette d'expression ou le sérotype pour leur efficacité thérapeutique et l'absence de toxicité dans les doses thérapeutiques. Dans une optique de réduction, nous souhaitons réaliser une étude de tolérance des produits de thérapie génique développés pour ces pathologies avant d'engager une étude complète de toxicologie réglementaire nécessaire dans le cadre d'essais cliniques. La mise en évidence d'une toxicité trop proche de la dose efficace rendrait inutile la réalisation d'une étude réglementaire avec le/les produit/s considéré/s puisqu'ils ne seront plus considérés comme susceptible d'être utilisés chez l'homme.

Remplacement : Les transgènes sélectionnés et évalués dans ce projet correspondent à une version normale des gènes déficients et ont été préalablement testés in vitro. Les études de tolérance d'un vecteur ne peuvent se faire qu'in vivo car son effet va dépendre de son tropisme par rapport aux organes.

Réduction : Comme indiqué plus haut, cette étude a pour objectif d'identifier tôt dans le développement d'un produit thérapeutique ceux pour lesquels le développement préclinique s'avèrerait inutile. L'utilisation de groupes d'animaux sains permettra de s'affranchir du biais lié à la pathologie et donc de réduire la variabilité et par conséquent le nombre d'animaux. De plus, un groupe d'animaux non traités unique est utilisé pour l'ensemble des groupes, permettant de réduire le nombre d'animaux.

Raffinement : Ces études seront menées chez le rat afin de pouvoir faire des transpositions avec les éventuelles études ultérieures de toxicité réglementaires où cette espèce est utilisée. Un prélèvement de sang au cours de l'étude permettra une analyse de biomarqueurs, ce qui permettra de mieux suivre l'effet des produits sur les animaux. Des mesures adaptées pour réduire le stress seront mis en place. En particulier, les rats étant des animaux sociaux, aucun rat ne sera seul dans une cage. Une phase d'adaptation de 7 jours sera mise en place avant l'entrée en protocole.

Par ailleurs, les prélèvements de sang au niveau de la veine sous-maxillaire seront réalisés sous anesthésie gazeuse et des points limites adaptés ont été définis pour prévenir la douleur ou l'inconfort des animaux.

Dans ce projet, nous estimons que 552 animaux seront utilisés. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études ainsi que sur un calcul de taille d'échantillon permettant une analyse statistique des résultats.

12322 Test de molécules innovantes pour le traitement de la narcolepsie de type 1. Mots clés: sommeil, narcolepsie, vigilance, traitements pharmacologiques. Durée du projet: 5 ans. Type du projet : Recherche fondamentale, étude préclinique. Nombre d'animaux nécessaires : 190 souris.

La narcolepsie de type 1 est une maladie neurologique rare dont les principaux symptômes sont l'hypersomnolence diurne, la fragmentation du sommeil de nuit et les cataplexies. La cataplexie est une perte de tonus musculaire pendant l'éveil, déclenchée par une émotion positive, qui s'accompagne souvent par la chute de la personne. C'est une maladie handicapante ayant un fort impact négatif sur la qualité de vie des patients. La maladie est la conséquence de la mort des neurones à hypocrétine/orexine qui fait suite à une attaque auto-immune.

Aucune cure n'existe à ce jour et les traitements disponibles sont symptomatiques, basés sur l'utilisation de stimulants pour favoriser l'éveil et d'antidépresseurs pour réduire l'apparition des cataplexies. Ces traitements sont d'une efficacité modérée, peu spécifiques et contraignants. L'objectif de notre projet de recherche est de développer un traitement original, performant et ciblé pour le bénéfice des patients. Pour cela, nous testerons dans un modèle de souris narcoleptiques, des molécules originales innovantes afin de développer un traitement ciblé, efficace et potentiellement moins apte à induire des effets secondaires. Compte tenu du traitement fait aux animaux, aucun effet néfaste n'est attendu. Le degré de sévérité prévu pour ce protocole expérimental est modéré. Toutefois, un suivi quotidien du bien-être des animaux sera réalisé.

Chaque animal ne sera soumis qu'à une seule et unique procédure expérimentale avec mise à mort requise pour les analyses post-mortem sur le cerveau, éliminant toute possibilité de réutilisation.

Il est évident que nous répondrons explicitement aux principes et exigences des 3R :

Remplacement: Nos travaux seront conduits chez la souris, un modèle reconnu de narcolepsie de type 1 exprimant l'hypersomnolence diurne, la fragmentation du sommeil et les cataplexies. Les réseaux neuronaux responsables du sommeil et de l'éveil que nous ciblons sont communs aux mammifères, incluant les rongeurs et l'homme, et aujourd'hui bien identifiés.

Réduction: Le nombre d'animaux prévu est légitimé par l'organisation de l'étude autour de deux volets expérimentaux indépendants. Il tient compte des « erreurs et échecs » aux différentes étapes des procédures appliquées aux animaux. Pour la durée complète du projet, il est prévu un total de 190 animaux, répartis en 19 lots expérimentaux. La taille respective des lots a été calculée de manière à ne pas compromettre les objectifs scientifiques et la significativité des données (petits échantillons).

Raffinement: Par notre expérience d'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques, nous sommes conscients que l'étude du sommeil qui constitue notre corps de métier au laboratoire requiert des animaux constamment placés dans les meilleures conditions psycho-physiologiques. Les cataplexies ne s'expriment que si les souris, comme les humains, sont dans des conditions de bien-être. Les conditions d'élevage, de soins post-opératoires, d'hébergement et les procédures expérimentales sont d'ores et déjà maîtrisées. Les expérimentations seront réalisées par des personnels compétents, formés et suivis dans leur carrière dans le cadre de leur formation continue à l'expérimentation animale.

12323 *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie responsable d'infection pulmonaire grave chez les patients atteints de mucoviscidose et chez les patients en réanimation. Cette bactérie, au gré de successives antibiothérapies, devient résistante à tous les antibiotiques habituellement utilisés. Aussi il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques aux antibiotiques comme les probiotiques. Les probiotiques, parmi lesquels certaines souches de *Lactobacillus*, sont des

microorganismes qui, administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte.

Lors d'une précédente étude, 1 mélange de 3 souches de lactobacilles issus de patients atteints de mucoviscidose nommé Lactobacilli psb « Lpsb » (*L. paracasei*, *L. salivarius*, *L. brevis*) a été administré par voie intranasale de manière préventive dans un modèle murin d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*. Nous avons démontré que ce traitement préventif respiratoire à base de Lactobacilli diminuait de façon significative la quantité bactérienne pulmonaire à *P. aeruginosa* 24h après l'infection, par rapport au groupe de souris n'ayant pas reçu les Lactobacillus.

Par la suite, chacune des 3 souches a été administrée indépendamment des 2 autres par voie intranasale dans le même modèle murin. Nous avons démontré que le traitement préventif respiratoire à base de *L. salivarius* et de *L. brevis* diminuait la quantité bactérienne pulmonaire à *P. aeruginosa* 24h post-infection par rapport au groupe de souris n'ayant pas reçu de lactobacille et celles ayant reçu *L. paracasei*.

Au vu de ces résultats prometteurs, les investigations nécessitent d'être poursuivies afin de tester le mélange des 2 souches de Lactobacillus préalablement identifiées (*L. salivarius* + *L. brevis*) pour son activité contre *P. aeruginosa*. En effet, ces 2 souches exercent une forte inhibition vis-à-vis de *P. aeruginosa* indépendamment l'une de l'autre, les mélanger pourrait ainsi potentialiser leur effet.

Nous souhaitons également savoir si l'effet observé est le même lorsque ces 2 souches sont désactivées par la chaleur.

Nous utiliserons 28 souris, afin de mener à bien ces expérimentations.

Nous analyserons la quantité de *P. aeruginosa* dans le poumon 24 heures après l'instillation du pathogène.

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

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

12324 Ce dossier est un renouvellement concernant la continuité du projet validé et démarré en février 2013.

Selon l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm, 2008) le cancer est responsable d'un décès sur trois pour les hommes et d'un sur quatre pour les femmes. Depuis 1989, il a été la principale cause de décès en France, devant les maladies cardiovasculaires. Malgré les progrès indéniables réalisés au cours des 15 dernières années en matière de dépistage, de diagnostic et de soins (thérapies ciblées, médecine personnalisée), les besoins et attentes médicales de la société restent très importants.

Cependant, pour offrir de nouvelles chances aux patients, il est essentiel pour la communauté scientifique de coopérer et de développer des compétences et des talents. C'est la vision partagée de deux entreprises, ainsi le programme mis en place pourrait conduire au développement de traitements anticancéreux hautement ciblés basés sur la radioimmunothérapie, une technologie qui fait aujourd'hui partie d'un nombre croissant de programmes de recherche préclinique et clinique en France et dans le monde.

Dans ce projet de radio-immunothérapie, l'anticorps bispécifique généré pré-cible les cellules cancéreuses et sert de site d'ancrage à un isotope rare, actuellement au cœur de recherches en médecine nucléaire. Les ondes courtes (alpha) générées par cette isotope radioactif sont utilisées

pour détruire localement les cellules cancéreuses. Cette approche en deux temps, plus spécifique que la radiothérapie classique, évite d'irradier et ainsi d'endommager les cellules saines.

La radio-immunothérapie pré-ciblée (pretargeted radioimmunotherapy = PRIT), comme son nom l'indique, cible spécifiquement un antigène donné.

La mise au point de cette stratégie est complexe et est basée sur différentes étapes. La première consistant à injecter l'anticorps bispécifique ciblant l'antigène d'une part et un composé chimique d'autre part. Cet anticorps va se fixer à l'antigène exprimé à la surface des cellules tumorales. Dans un deuxième temps un agent de neutralisation (clearing agent = CA) va être administré pour éliminer tout le surplus d'anticorps qui ne s'est pas lié aux cellules tumorales évitant par la suite toute toxicité périphérique. Enfin, dans un dernier temps, l'isotope lié au composé chimique va cibler l'autre partie anti-composé chimique de l'anticorps et se lier pour former un complexe qui va provoquer une irradiation alpha locale au niveau des cellules tumorales.

La stratégie initiale est d'administrer PRIT seul pour déterminer son efficacité, sa toxicité, son dosage et ses paramètres pharmacocinétiques sur différents modèles tumoraux chez les souris. Dans un deuxième temps, pour des tumeurs insensibles ou résistantes PRIT sera amenée à être combinée à différents composés comme des chimiothérapies ou bien d'autres anticorps ayant la propriété de stimuler le système immunitaire et d'avoir éventuellement un effet complémentaire, additif ou synergétique.

Nombre d'animaux utilisés pour le projet: 7200 pour 5 ans.

Nous réduisons le nombre d'animaux utilisés en respectant la règle des 3R "Remplacer, Réduire et Raffiner". Pour ce faire, nous avons mis en place des procédures strictes. Nous limitons le nombre d'expériences à ce qui est indispensable. Chaque protocole est discuté puis approuvé par la hiérarchie. Avant chaque démarrage d'expérience, un protocole expérimental est rédigé puis respecté ; cela nous permet d'éviter toutes répétitions.

Mais il importe aussi d'utiliser autant d'animaux que nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement fiables. À défaut d'employer suffisamment d'animaux, les résultats sont peu significatifs.

À ce jour, il n'existe aucune méthode de substitution connue. Les composés doivent impérativement être administrés chez l'animal, ici la souris, afin d'en apprécier l'innocuité et l'efficacité dans un contexte mimant au mieux la pathologie ciblée. L'utilisation de souris est justifiée par le développement de la biologie moléculaire qui a abouti à la création de nombreux modèles murins génétiquement modifiés, et par l'existence de lignées immuno-compromises (nude, scid,scid/bg) qui autorisent la greffe de cellules tumorales humaines.

Nous estimons à 1 et 2 les grades de sévérité pour nos protocoles.

Pour réduire la douleur des animaux nous utilisons différentes méthodes telles que l'anesthésie, l'analgésique et l'asepsie. Le réveil après une anesthésie à l'isoflurane est généralement rapide et calme. Un appareil de chauffage est utilisé pour éviter la perte de chaleur et garder une température aussi constante que possible. L'analgésique est utilisé pour les chirurgies en pré et post opératoire pour réduire la douleur et la cicatrisation. Afin d'éviter toutes éventuelles infections, la priorité est une désinfection de la région à opérer et l'asepsie pendant la chirurgie.

Tous les animaux utilisés lors des expériences seront euthanasiés à la fin ou selon " les critères d'arrêt par rapport à la souffrance".

Toutes ces études précliniques vont pouvoir servir de référence pour le développement futur de PRIT en clinique.

12325 Les techniques modernes de neuroimagerie telles que l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRM-f) ont révolutionné le domaine des neurosciences cognitives en permettant de mesurer non invasivement l'activité cérébrale. Cependant, elles ne mesurent pas directement l'activité neuronale mais le changement hémodynamique associé à l'activation neuronale. Cette relation s'appelle le couplage neurovasculaire. Les mécanismes et les médiateurs du couplage neurovasculaire sont malheureusement encore mal connus.

Récemment, il a été suggéré que la rupture du couplage neurovasculaire pourrait être impliqué dans de nombreux états pathologiques et traumatologiques tels que la maladie d'Alzheimer et les accidents vasculaires cérébraux. Par conséquent, comprendre comment le couplage neurovasculaire évolue avec le vieillissement et la maladie s'avère être un objectif majeur de la recherche actuelle.

Notre projet de formation est d'introduire les jeunes chercheurs émergents aux dernières techniques de mesures de réseau neuro-vasculaire, en étudiant les interactions vasculaires et neuronales au niveau du cortex sur les modèles de rongeurs rat et souris anesthésiés principalement au travers d'une fenêtre crânienne.

Pour ce projet de formation, nous utiliserons 36 souris (22 de lignée sauvage et 14 de lignées transgéniques sans phénotype dommageable) et 6 rats (lignée sauvage) par an, soit 210 animaux pour la durée totale du projet, et nous nous appliquerons à suivre le principe des 3R.

(i) Réduction: l'expertise de nos instructeurs depuis 15 ans sur ces modèles garantit que le nombre d'animaux utilisés est minimisé par une pratique toujours de haute qualité dès le départ. De même il est extrêmement important pour nos objectifs éducatifs de pouvoir démontrer et mettre en pratique les actes de préparation chirurgicaux, le nombre d'animaux sera donc adapté en conséquence. Un même animal sera ensuite utilisé pour enregistrer plusieurs signaux simultanément, ce qui permettra une réduction du nombre d'animaux.

ii) Raffinement : les méthodologies utilisées dans ce projet impliquent la mise en oeuvre de toutes les stratégies expérimentales et pharmacologiques disponibles actuellement pour réduire le nombre d'animaux utilisés mais aussi minimiser les possibles effets délétères pour ceux-ci. Ainsi, nos mesures mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales impliquent une induction et suivi de l'anesthésie, une mise en place d'analgésie en pré et post-opération, une installation tout au long des procédures chirurgicales de contrôle de la température par tapis chauffant, avec un respect particulier de la notion de points limites adaptés à chaque procédure (critères d'interruption en cas de souffrance des animaux).

(iii) Remplacement : le lien entre le système neuronal et la BHE ne peut être étudié avec des modèles in vitro de cellules en culture, nous ne pouvons donc pas remplacer ce modèle animal.

12326 L'antibiorésistance est un problème d'actualité, que ce soit en médecine vétérinaire ou en médecine humaine. Le risque majeur est de se retrouver face à des bactéries qui seraient résistantes à tous les antibiotiques et donc des infections bactériennes impossibles à soigner. La colistine fait partie des antibiotiques de dernier recours en médecine humaine, c'est-à-dire ceux qui sont utilisés comme dernier rempart quand tous les autres ne sont plus efficaces. En médecine vétérinaire, la colistine est encore largement utilisée, notamment pour traiter les infections digestives lors du sevrage chez le porc. Cependant, depuis 2015, un nouveau mécanisme de résistance spécifique à la colistine a été découvert et a alerté la communauté scientifique sur les usages de cette molécule. Il est admis qu'il faut réduire son utilisation (notamment en médecine vétérinaire). Aussi, afin de préserver l'efficacité de la colistine, des alternatives ont été développées : elles reposent notamment sur un usage par combinaison entre la colistine et une (ou des) huile(s) essentielle(s).

Les huiles essentielles sont issues des végétaux et certaines présentent une légère activité antibactérienne. D'autres n'ont pas d'action antibiotique en tant que tel mais permettent de potentialiser l'action d'un antibiotique. Dans nos laboratoires nous avons, dans un premier temps, réussi à solubiliser cette molécule en l'intégrant dans des nanocapsules. Puis il a été montré qu'une association entre le Farnésol (composant majoritaire de l'huile de tilleul et d'acacia) et la colistine est intéressante pour combattre certaines souches bactériennes résistantes à la colistine. Ceci permettrait de réduire les doses de colistine à utiliser tout en gardant son efficacité. Ces essais prometteurs ont été réalisés in vitro et demandent à être confirmés in vivo chez le porc.

Cependant, avant d'étudier l'efficacité, il faut s'intéresser à l'innocuité de cette huile essentielle et notamment réaliser une étude de cinétique : il s'agit d'évaluer les paramètres liés à son absorption, sa distribution dans l'organisme et sa vitesse d'élimination. Pour cela, des prises de sang et des récoltes d'urine régulières seront réalisées sur des porcs ayant reçus du farnésol (dans des

nanocapsules, par voie orale et intraveineuse), afin de suivre les concentrations en farnesol sanguines et urinaires au cours du temps. Ceci permettra de déterminer la biodisponibilité de cette molécule, à savoir le pourcentage de la dose orale atteignant la circulation sanguine générale.

En l'absence de données préalables et suffisantes dans la littérature scientifique, il s'agit d'effectuer une étude pilote qui servira à ajuster de façon optimale le protocole lors d'une future étude sur le porc, en terme de nombre d'animaux et de prélèvements.

Pour cette étude pilote, la règle des 3R a été prise en compte :

- Remplacer : Les modèles sur cultures de cellules n'étant pas représentatifs de la complexité des processus physiologiques qui gouvernent la cinétique des molécules (absorption, distribution, élimination), le recours à des animaux est incontournable.

- Réduire : le nombre d'animaux est minimisé car il s'agit d'une étude préliminaire mais doit être suffisant pour bien appréhender la variabilité biologique. Ainsi, six porcs maximum seront utilisés. L'utilisation des modèles informatiques développés permettra ensuite de prédire la pharmacocinétique de ces antibiotiques selon d'autres scénarios, sans utilisation supplémentaire d'animaux

- Raffiner : Les prises de sang répétées seront effectuées après la pose chirurgicale de cathéters (avec recours à une anesthésie et une analgésie suffisante pour les animaux), permettant ainsi une récolte de sang non-douloureuse et limitant le stress. La contention sera effectuée par des opérateurs formés, assurant la sécurité des animaux et des opérateurs et minimisant les sources d'inconfort pour les animaux. Cependant, des points limites et critères d'arrêt ont été définis afin de permettre une intervention rapide sur les animaux.

12327 L'hématopoïèse est le processus de production de toutes les cellules sanguines. Celles-ci sont produites à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et des progéniteurs hématopoïétiques localisés, chez l'adulte, dans la moelle osseuse. La différenciation et la prolifération des CSH et de progéniteurs doivent être finement régulées pour éviter l'épuisement du stock de CSH et des progéniteurs, ainsi que leur transformation en cellules malignes (transformation leucémique). Un des traitements dans le cas d'hémopathie maligne (cancer des cellules hématopoïétiques) est la transplantation de cellules souches saines. Dans le cadre des protocoles cliniques de thérapie cellulaire et géniques pour la transplantation de cellules souches, les cellules sont souvent maintenues quelques jours en culture. Lors de cette étape, le nombre de radicaux libres augmente dans ces cellules, ce qui altère leur capacité fonctionnelle. Pour empêcher cette perte et s'assurer du succès de la transplantation, un nombre plus important de cellules souches doit être greffé.

Ainsi, nous souhaitons évaluer l'effet d'un traitement ex vivo des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques avec des antioxydants. Le but de ce traitement est d'éliminer et/ou de maintenir la production de radicaux libres basse, afin de maintenir les propriétés fondamentales de ces cellules, à savoir leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation. Des tests in vitro seront réalisés pour évaluer l'effet des antioxydants sur la préservation des propriétés fonctionnelle des CSH.

Pour évaluer la capacité de reconstitution hématopoïétiques et d'auto-renouvellement des CSH, nous allons effectuer des transplantations in vivo chez un modèle rongeur, la souris. En effet, tester la capacité d'auto-renouvellements des CSH ne peut se faire in vitro puisque in vitro, il a été démontré que les CSH perdent cette capacité. Ainsi seul les tests de transplantation chez la souris permettront d'avoir une preuve définitive quant à l'effet du traitement par des antioxydants sur la préservation de la capacité d'auto-renouvellements des CSH.

Ce projet permettra d'améliorer les protocoles cliniques de thérapie cellulaire et génique à base de cellules souches hématopoïétiques.

Le nombre d'animaux (1350 sur 5 ans) a été calculé en tenant compte des mises au point et des résultats des études précédentes. Il a été ajusté au minimum pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Ceux utilisés sont nés dans notre animalerie. Les protocoles

expérimentaux seront effectués sous anesthésie générale pour éviter stress et douleurs aux animaux.

Pour les transplantations de moelle osseuse, les souris sont préalablement irradiées puis greffées avec les cellules de moelle osseuse.

12328 Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la tumeur maligne primaire du foie la plus fréquente chez l'être humain. A l'échelle globale, le CHC est le cinquième cancer le plus fréquent chez l'homme, et le septième chez la femme. En raison du diagnostic souvent tardif, et des options thérapeutiques limitées, le CHC représente la troisième cause de mortalité due au cancer dans le monde. Sur le plan physiopathologique, il est admis que la carcinogenèse du CHC repose sur un mécanisme d'inflammation chronique du parenchyme hépatique, responsable de cycles répétés d'apoptose et de régénération hépatocellulaire, favorisant l'incidence d'erreur de réplication de l'ADN, et la prolifération cellulaire dérégulée. Durant les dernières décennies, les causes sous-jacentes à l'inflammation hépatique étaient considérées comme étant systématiquement liées à la présence d'une hépatite virale (hépatite B, hépatite C). Néanmoins, grâce à une couverture vaccinale contre l'hépatite B de plus en plus large, et à la commercialisation de nouveaux médicaments antiviraux contre l'hépatite C, il est envisagé que l'impact épidémiologique de ces infections devrait diminuer dans prochaines décennies.

En revanche, l'épidémie d'obésité et le syndrome métabolique qui en découle (et ses conséquences hépatologiques ; le non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), et le non-alcoholic steatohepatitis (NASH) sont de plus en plus souvent incriminé comme un facteur de risque important de carcinome hépatocellulaire. Il est important de souligner que les patients de NAFLD et NASH (même sans cirrhose) présentent un risque de développer un carcinome hépatocellulaire particulièrement élevé comparé aux patients sans NAFLD. Cependant, les mécanismes expliquant comment le NAFLD/NASH favorise l'émergence du carcinome hépatocellulaire restent mal compris. Certains auteurs évoquent un rôle du microbiote intestinal, et de son altération (la dysbiose intestinale) sur la progression des hépatopathies chroniques.

Ce projet a donc pour but de maintenir et produire pour un client un modèle murin sur lequel ce dernier pourra étudier l'impact du microbiote intestinal et ses interactions avec le NAFLD et l'immunité intra-hépatique dans le contexte du carcinome hépatocellulaire.

Afin de répondre aux besoins de ce client, nous croiserons entre elles les lignées ; c-Myc-OVA (B6.D2-Tg (tetO-MYC,-OVAL)#Gtgm/leg) et LAP-tTA (B6.NMRI-Tg (Cebpb-tTA) 5Bjd/Cnbc) (ces deux lignées ne développent pas de phénotype dommageable quand elles sont maintenues séparément).

La nouvelle lignée de souris transgénique ainsi créée possède un phénotype normal quand les animaux sont gardés sous doxycycline. A l'arrêt de la doxycycline, la protéine tTA (transactivatrice de la tetracycline) est libérée dans les hépatocytes. Cette protéine est capable de se lier à la séquence TRE et induit ainsi dans ces cellules l'expression de c-Myc et de l'ovalbumine. C-Myc étant un proto-oncogène, la formation de nodules tumoraux sera induite dans le foie. Cette lignée constitue donc un bon modèle pour étudier le CHC.

Pour réprimer ce mécanisme, nous alimenterons les parents et les petits issus de ces croisements avec de l'aliment enrichie en doxycycline. Cependant, et afin que notre client puisse réaliser ses expériences, nous stopperont l'ajout de l'alimentation enrichie en doxycycline avant l'expédition des animaux. Selon les données de la littérature, les animaux portant les deux transgènes ne développent des nodules de CHC qu'entre la 8ème et la 16ème semaine suivant l'arrêt de la doxycycline. Les animaux étant expédiés entre 4 et 6 semaines d'âges, ils ne développeront donc le phénotype que chez notre client.

De plus et afin que notre client puisse étudier l'impact de la stéatose maternelle sur l'incidence du CHC dans sa descendance et le rôle du microbiote dans le développement de CHC chez des souris adultes, certains animaux seront alimentés avec une nourriture grasse et sucrée (contenant également de la doxycycline). Selon l'expérience de notre client, cette alimentation enrichie n'induit pas d'inconfort particulier pour les animaux.

La règle de raffinement sera appliquée en plaçant les animaux dans des conditions optimales de température avec un cycle jour/nuit de 12h/12h, et seront maintenus dans un environnement enrichi. Ils auront accès sans restriction à l'eau et à la nourriture. Les animaux ne développeront le phénotype que chez notre client, ils seront néanmoins surveillés quotidiennement par du personnel qualifié.

Nous estimons qu'un total de 11 660 animaux sera utilisé dans ce projet (reproducteurs, animaux expédiés et animaux de non intérêt compris). La règle de la réduction sera appliquée en favorisant le nombre et le schéma de croisement optimal permettant de répondre au mieux aux besoins du client.

12329 Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde, aussi bien dans les pays développés que dans ceux en voie de développement. De plus, l'incidence de la mortalité cardiovasculaire augmente avec les facteurs de risque cardiovasculaire, notamment l'hypertension artérielle et le diabète. Plusieurs études précliniques et cliniques ont montré que l'hypertension artérielle était précocement associée à une dysfonction endothéliale participant au développement du remodelage vasculaire et cardiaque, menant à terme à des épisodes aigus (infarctus, AVC, etc.) et à une insuffisance cardiaque. Bien que les thérapies anti-hypertensives actuelles, comme les inhibiteurs calciques et les médicaments ciblant le système angiotensine, permettent de réduire la pression artérielle de façon efficace, elles ne semblent restaurer la protection vasculaire que de très partiellement.

Une récente étude clinique a montré qu'un nouveau traitement antidiabétique pouvait diminuer de 38 % le risque d'un premier événement cardiovasculaire chez des patients atteints d'un diabète de type 2 avec un haut risque cardiovasculaire. L'étude clinique a aussi montré une forte réduction (35%) du nombre d'hospitalisation pour insuffisance cardiaque, indiquant que cette molécule aurait un fort effet protecteur sur le système cardiovasculaire. Toutefois, les effets protecteurs de ce traitement vis-à-vis du système cardiovasculaire ne peuvent pas s'expliquer par le seul effet antidiabétique relativement faible, suggérant un effet protecteur direct de la molécule sur les vaisseaux sanguins et le cœur.

Le but du présent projet est donc d'évaluer l'effet protecteur d'un nouvel antidiabétique oral sur l'induction des répercussions cardiaques par échocardiographie dans un modèle d'hypertension artérielle non lié au diabète. L'analyse des paramètres de la morphologie et de la fonction cardiaque par échocardiographie est un examen de référence pour le diagnostic et le suivi des pathologies cardiaques, notamment des insuffisances cardiaques liées à l'hypertension. Cet examen est de plus non invasif car il se fait par échographie transthoracique.

Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 69 rats du fait de l'application de la règle des 3R. Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait que les altérations vasculaires et cardiaques sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. La réduction des effectifs est liée à l'utilisation de techniques et d'approches statistiques adaptées (ANOVA et/ou test non-paramétriques). Enfin, le raffinement se fait par une prise en compte du bien-être animal (enrichissement du milieu et soins quotidiens aux animaux) et par le recours à une méthode de mesure non-invasive (échocardiographie doppler). Afin de limiter le stress lié la manipulation et à la contention, l'échocardiographie se fait sous anesthésie générale gazeuse.

12330 Les personnes travaillant avec des animaux de laboratoire doivent maîtriser des gestes techniques plus ou moins complexes : administrations, prélèvements,.... Leur formation initiale doit parfois être complétée par une formation spécifique (sur des espèces domestiques), en fonction des études qu'ils seront amenés à faire et de l'évolution des connaissances et pratiques.

Le but de ce projet est de décrire le processus d'acquisition de gestes techniques réalisés sur gros animaux (chiens et porcs), au cours des études précliniques.

Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser 75 chiens et 50 porcs sur 5 ans. Il s'agira d'animaux sortant d'une étude (animaux réutilisés).

La personne en formation sera systématiquement accompagnée lors de sa formation par une personne experte dont la maîtrise est reconnue pour le geste. La formation se divisera en plusieurs étapes : formation théorique, observation, réalisation sous une supervision directe, réalisation sous une supervision à distance. Au cours de chaque étape, le nombre de répétitions pourra varier en fonction de la complexité du geste et de l'aptitude de la personne en formation à acquérir le geste.

Pour valider l'acquisition des gestes, la personne experte tiendra compte de critères de réussite et de critères de réalisation, définis pour chaque procédure.

- Remplacement: Pour ce projet, il n'existe pas de méthode de substitution, qui pourraient restituer fidèlement les comportements et réactions des animaux et/ou la manipulation des tissus vivants. Ces gestes étant très spécifiques de l'espèce, ils doivent être acquis chez l'espèce cible.

- Réduction: Les animaux seront issus d'études et utilisés pour 2 ou plusieurs procédures de ce projet. Une supervision étroite garantira une utilisation optimale des animaux en minimisant le risque d'erreur.

- Raffinement: Les animaux bénéficient d'un enrichissement social et physique dans la zone d'hébergement. Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux sera réalisé avec une recherche systématique de points limites.

Les procédures sont réalisées par du personnel déjà formé aux sciences et techniques des animaux de laboratoire, mais devant acquérir une expertise supplémentaire. Ce personnel en formation sera toujours sous la supervision d'une personne experte.

Ces phases de formation servent également de training et/ou de maintien d'exercice de travail afin que les animaux ne perdent pas leur niveau d'habituation acquis lors d'étude antérieure et pouvant servir lors d'étude postérieure.

12331 Nos projets sont d'expérimenter sur les souris transgéniques knock-out qui n'expriment pas des protéines essentielles à l'activité électrique des neurones codées par les gènes CACNA1D, KCND3, KCNN3, LGI1, SARM1. En effet les conséquences phénotypiques de l'absence d'une protéine dans l'animal renseignent sur les fonctions de cette protéine. Pour cela nous devons identifier les souris homozygotes porteurs des mutations invalidantes, les homozygotes sauvages et les hétérozygotes. L'identification doit être réalisée avant la fin de la deuxième semaine post-natale car l'expérimentation après euthanasie des souris se fait sur des tranches de cerveaux juvéniles maintenue en survie et sur lesquels des enregistrements électrophysiologiques sont menés.

Les mères gestantes sont hébergées seules, dans des cages enrichies de boîtes à œufs en carton sous lesquelles elles s'abritent pour mettre bas.

Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum permis par la nécessité d'obtenir des résultats statistiquement significatifs et reproductibles. Dans ces conditions, le total des animaux devant subir la procédure de génotypage/identification par ablation de phalanges en 5 ans sera de 2150, une fois considérées toutes les lignées et toutes les analyses qui seront réalisées sur les différentes lignées. Nous rappelons que ce nombre d'animaux correspond à l'utilisation par l'ensemble du laboratoire (20 chercheurs, étudiants ou post-docs utilisant ce matériel biologique) au sein de projets financés par de multiples agences nationales et internationales (ANR, FRM, ERC), et également par l'EPST de tutelle à la suite de l'évaluation du projet quinquennal de laboratoire par l'HCERES.

D'autre part, les structures cérébrales étudiées ne présentant pas de dimorphisme sexuel, nous utiliserons les animaux des deux sexes. Ceci permettra de limiter considérablement le nombre de portées générées et le nombre d'animaux sacrifiés.

La procédure de génotypage/identification proposée a été démontrée comme étant celle produisant les stress et inconfort minimaux sur des animaux de cet âge.

12332 Les biofilms bactériens sont composés de cellules bactériennes enrobées d'une matrice polymérique et attachés à une surface. Cette matrice, sécrétée par les bactéries, les protège et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. Par conséquent, le biofilm

permet aux bactéries d'échapper au système immunitaire de l'hôte et les rend plus résistantes aux antibiotiques. La capacité à former un biofilm est une caractéristique reconnue chez plusieurs microorganismes. La présence de biofilms lors d'infections est donc un problème et nécessite des traitements innovants.

Afin d'optimiser l'efficacité des antibiotiques actuels contre ces biofilms bactériens, nous avons généré des nanoparticules de polymères encapsulant ces antibiotiques. Ces nanoparticules sont ensuite armées d'anticorps spécifiques dirigés contre le biofilm (anticorps d'adressage), constituant un véritable cheval de Troie muni d'un GPS.

Nous avons pu tester l'efficacité de cette « construction » dans un modèle in vitro. Cependant, les nanoparticules ont une taille proche de 100 nm et sont recouvertes d'anticorps, les rendant ainsi très immunogènes si elles sont injectées à un organisme vivant.

Dans cette étude, nous souhaitons donc évaluer l'impact de nos nanoparticules dans le traitement de bactéries formant un biofilm grâce à un modèle murin. Des disques de prothèse vasculaire (6 mm de diamètre) seront recouverts par des *Staphylococcus aureus* bioluminescents : bactéries formant un biofilm et génétiquement modifiées pour émettre de la lumière de façon constitutionnelle. Sous anesthésie, une petite incision sera pratiquée sur la peau du dos des souris afin d'y implanter un disque de prothèse vasculaire (6 mm de diamètre) recouvert par des *Staphylococcus aureus* bioluminescents. Après 24h, les animaux seront anesthésiés à nouveau et une première image de l'implant sera réalisée à l'aide d'un système d'imagerie in vivo non-invasif : le BRUKER Xtreme II. Les animaux seront ensuite traités quotidiennement par une injection intrapéritonéale de nanoparticules recouvertes d'anticorps d'adressage, ou de nanoparticules seules, d'antibiotique seul ou de véhicule comme contrôles. Ce traitement sera dispensé pendant 7 jours. Le suivi de l'infection sera réalisé tous les jours par imagerie in vivo. En point final, les souris seront mises à mort par surdose d'anesthésique, puis le sang et les disques de prothèse seront collectés pour analyses. Les points limites seront les suivants: prostration, infection flambante ou généralisée visible par l'imagerie si l'un de ces signes est observé l'animal sera mis à mort sans délai. Les animaux ayant reçu le véhicule seul seront mis à mort à 48h de l'implantation afin d'éviter une septicémie.

Chaque traitement sera reçu par un groupe de 8 souris :

- * Nanoparticules recouvertes d'anticorps d'adressage
- * Nanoparticules seules
- * Antibiotique seul
- * Anticorps seul
- * Véhicule (Phosphate Buffered Saline)

5 groupes de 8 souris, soit 40 souris

Si les résultats sont concluants, le protocole complet sera réitéré deux fois soit 80 souris supplémentaires pour un total de 120 souris.

Dans le cadre de la règle des 3R :

Remplacer : la dose optimale de nanoparticules à injecter a été déterminée auparavant par des tests in vitro.

Réduire : une seule dose est donc testée et permet de réduire le nombre de groupes. De même les effectifs de chaque groupe ont été réduits au maximum tout en restant statistiquement exploitables. De plus l'imagerie in vivo est une méthode non invasive et permet de réduire le nombre d'animaux grâce au suivi longitudinal de chaque animal.

Raffiner : Les souris seront maintenues en groupes sociaux avec enrichissement et des soins quotidiens leurs seront prodigués. Les actes chirurgicaux seront réalisés sous anesthésie générale dans les règles de l'art par une personne qualifiée. L'analgésie post opératoire sera sous forme de patch de fentanyl à diffusion continue. L'évaluation de l'infection par les bactéries et donc du point limite est réalisée par une technique d'imagerie très sensible et permettant un diagnostic très précoce.

12333 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un industriel qui développe des composés thérapeutiques dans le domaine des troubles métaboliques. Au cours d'études cliniques menées précédemment par le client sur des patients diabétiques, le composé X a présenté des effets bénéfiques inattendus sur la fonction cardiovasculaire. Deux mécanismes d'action semblent être responsables de ces effets cardiovasculaires :

- une amélioration de la distribution en oxygène au niveau des organes, notamment au niveau du cœur et des muscles.
- une utilisation accrue des corps cétoniques en tant que source énergétique, le composé X étant connu pour augmenter la production de corps cétoniques.

Ces effets laissent suggérer que le composé X puisse induire une amélioration des performances physiques (meilleure oxygénation des muscles associée à une oxydation accrue des corps cétoniques, ces derniers étant aujourd'hui utilisés comme dopants par les sportifs).

Cette hypothèse sera explorée par la présente étude sur un modèle de rats diabétiques (rats ZDF) nourris avec une alimentation enrichie en graisse (60% d'énergie sous forme de graisses), soumis à de l'exercice physique sur tapis roulant. Elle visera ainsi à évaluer les effets du composé X au cours de tests physiques de performance (Test incrémental) et d'endurance (Test de temps limite). Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de mieux caractériser les effets physiologiques et de mieux comprendre les mécanismes d'action de leur composé.

Le présent projet consistera :

- à entraîner régulièrement les animaux à une course sur tapis roulant (intensité de l'activité modérée).
- à déterminer l'impact du traitement sur les performances physiques, la consommation en oxygène et le quotient respiratoire (VCO_2/VO_2) aux cours de deux tests d'activité physique, un test de performance (Test incrémental : mesure de la consommation de VO_2 maximum de l'animal) et un test d'endurance (Test de temps limite : mesure de l'endurance à une vitesse correspondant à 65% de la VO_{max}). Ces tests seront effectués dans un système permettant de mesurer les échanges respiratoires (tapis d'activité en calorimètre). Le composé X sera administré via la nourriture pendant 8 jours. Les résultats seront comparés à ceux obtenus chez des animaux contrôles recevant uniquement le véhicule. Des prélèvements sanguins seront pratiqués juste avant et après les entraînements, le test de performance et les test d'endurance et un prélèvement d'organes et de sang sera pratiqué à l'issue de l'étude. Au total, ce protocole nécessitera l'utilisation de 52 animaux divisés en 4 groupes de 13 animaux :

- deux groupes traités avec le composé X, l'un soumis à un test de performance après 8 jours de traitement, l'autre soumis à un test d'endurance (test de temps limite) après 8 jours de traitement.
- deux groupes « contrôle » traités au véhicule, l'un soumis à un test de performance après 8 jours de traitement, l'autre soumis à un test d'endurance (test de temps limite) après 8 jours de traitement.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le modèle animal d'obésité et de diabète qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur ces pathologies et leurs complications. Un enrichissement des cages d'hébergement sera assuré par l'ajout de briquettes de bois. Par ailleurs, les animaux seront suivis de façon quotidienne à l'aide de feuille de score de façon à détecter tout signe d'inconfort et de permettre une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.
- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience du laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt sur de nombreux modèles rongeurs obèses et diabétiques. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été calculé de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.
- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un traitement sur le métabolisme énergétique au cours d'une activité physique.

12334 Afin de préserver le bien-être des animaux, les personnes amenées à réaliser des gestes sur des animaux vivants doivent être formées et entraînées. Ainsi le geste bien maîtrisé ne provoquera qu'une gêne minimale à l'animal. Notre établissement participe à un programme de formation de niveau master sur les modèles d'évaluation de la douleur chez l'animal. Le but de cette formation est de présenter aux étudiants une batterie de tests comportementaux nociceptifs couramment réalisés chez l'animal dans notre établissement. Les tests comportementaux sont des tests nociceptifs thermiques au chaud ou mécaniques.

Cette formation pratique est dispensée par une personne experte. Tout au long de cette formation, une attention particulière est apportée au respect des 3 R : Remplacer ; Réduire ; Raffiner.

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation de l'animal pour cet apprentissage car la manipulation des êtres vivants demande de la maîtrise qui ne peut s'acquérir qu'en pratiquant avec l'animal vivant.

Réduire : Ce projet vise à former les étudiants aux tests comportementaux nociceptifs de base pratiqués au sein de notre unité de recherche. Pour limiter le nombre d'animaux nécessaire, le geste est d'abord expliqué à l'aide d'un schéma ou d'une vidéo. Pour la partie pratique nous n'utiliserons que des animaux qui ne peuvent pas être utilisés dans d'autres projets ou destinés à être mis à mort, par exemple parce qu'ils sont nés avec un génotype non souhaité ou car ils sont en fin de procédure expérimentale. Ce nombre sera réduit si la maîtrise du geste est acquise avant d'avoir utilisé tous les animaux prévus.

Raffiner : Avant d'expérimenter sur des animaux vivants, le geste est expliqué par le formateur, puis l'apprenant observe des personnes expertes dans la réalisation de ces gestes. Ensuite tous les gestes seront réalisés par les étudiants. Le nombre d'essais sur les animaux est limité à 4. De plus, les mêmes animaux vont pouvoir subir plusieurs tests successivement ; ceci est possible car les différentes procédures qui vont se succéder sur un même animal concernent la stimulation d'une partie différente du corps de l'animal (pattes ou queue) ou bien l'application d'une stimulation différente (thermique ou mécanique), et un délai de 10 min au minimum est appliqué entre chaque procédure expérimentale. Des points limites sont établis permettant de limiter la souffrance de l'animal.

Une estimation de 600 souris sur 5 ans est établie pour former 50 personnes à 7 tests comportementaux différents.

12335 Dans le cadre du développement de nouveaux traitements visant l'insuffisance cardiaque, notre partenaire cherche à mettre en place un modèle permettant de travailler dans des conditions pathologiques à même de révéler le potentiel thérapeutique de composés en développement.

Pour ce type d'approche, il est intéressant de disposer d'un modèle permettant de récapituler les symptômes majeurs observés chez l'homme. Dans ce cas, il s'agit d'une atteinte de la fonction cardiaque, ainsi que de la mort de tissu cardiaque (nécrose) et d'un effet sur la fréquence cardiaque.

Ce projet vise donc dans un premier temps à mettre en place un modèle murin validé dans notre structure, en le testant notamment avec un composé de référence. Lorsque ce modèle sera validé, nous prévoyons dans un second temps de tester plusieurs composés actuellement en développement chez notre partenaire (une nouvelle demande sera effectuée pour cela).

L'approche utilisée pour la mise en place du modèle utilisera une molécule : la Doxorubicine. Ce composé se fixe dans le noyau des cellules, bloquant la synthèse de l'ADN et de l'ARN : c'est un agent intercalant au niveau de l'ADN.

Ce composé entraîne une atteinte des cellules cardiaques, mais aussi hépatique. Dans la littérature, de nombreuses méthodes sont employées et une certaine mortalité est observée.

La première étape de ce projet servira donc à trouver le protocole d'injection ainsi que la dose la plus adaptée pour mettre en place le modèle de manière robuste, reproductible et éthique.

Il est en effet essentiel de mettre en évidence une atteinte cardiaque nécessaire au modèle, tout en évitant une atteinte hépatique mettant en danger l'animal.

Les animaux seront observés de manière quotidienne, notamment pour déterminer une éventuelle souffrance liée à une atteinte hépatique. De plus, le suivi de poids quotidien et de la consommation hydrique 3 fois par semaine, permettront de surveiller les animaux.

7 groupes de 10 animaux seront utilisés pour la mise en place du protocole, avec plusieurs doses ou séries d'administration à plus faibles doses. Une échographie permettra de déterminer l'impact au niveau de la fonction cardiaque. Les animaux seront suivis durant 4 semaines puis mis à mort. Nous pratiquerons des analyses post-mortem pour déterminer les atteintes tissulaires.

70 animaux seront donc utilisés pour la mise en place du modèle.

Le modèle une fois mis en place selon les critères définis (notamment cardiaque mais aussi lié à une éventuelle mortalité), nous testerons le modèle avec un composé ayant une efficacité prouvée pour améliorer la fonction cardiaque dans ce type d'insuffisance cardiaque, cela nous permettra de valider le modèle. 3 groupes de 15 animaux seront utilisés dans cette validation, soit 45 animaux.

Il n'existe à l'heure actuelle aucune possibilité de tester leur efficacité réelle en dehors de l'utilisation de modèles animaux.

Enfin, une fois que le modèle sera validé de manière complète, nous prévoyons de l'utiliser pour tester des composés, ce qui fera l'objet d'une demande d'autorisation de projet ultérieurement.

De manière théorique, nous sommes susceptibles d'utiliser 115 souris pour ce développement.

Néanmoins tous les efforts seront faits pour réduire autant que possible ce nombre tout en conservant une puissance suffisante d'analyse permettant de conclure.

12336 Le cancer du foie est une maladie en pleine expansion avec actuellement plus de 8500 nouveaux cas par an en France et plus de 7000 morts par an. Il survient sur fond de maladie chronique du foie dans plus de 95% des cas. En dehors des causes classiques d'hépatites (virale C, virale B, alcoolique), la stéato-hépatite dysmétabolique prend de plus en plus d'importance (NASH). Cette maladie est due à l'association de plusieurs cofacteurs tels que l'obésité, le diabète, l'hypertension artérielle, la dyslipidémie et l'hypoxie intermittente résultant d'apnées du sommeil. Elle entraîne à terme une cirrhose et peut induire le cancer du foie avant même le stade de cirrhose dans plus de 50% des cas. A ce jour, le seul traitement systémique approuvé pour le CHC à stade avancé est le sorafenib, un inhibiteur de tyrosine kinase multi-ciblé présentant une modeste amélioration de la survie globale de 7,9 mois à 10,7 mois. De plus, ce traitement entraîne souvent des effets secondaires altérant la qualité de la vie du patient. Par conséquent, il existe un besoin urgent de thérapies nouvelles, efficaces et sûres. La fibrose et/ou la cirrhose modifient la vascularisation hépatique, la composition de la matrice extracellulaire et le métabolisme des médicaments. Par conséquent, il est essentiel d'utiliser un modèle d'animal avec CHC sur le fond de NASH et également dans le contexte de Fibrose / cirrhose afin d'étudier dans des tests précliniques futurs l'efficacité sur les tumeurs, mais aussi la tolérance du traitement.

Dans ce projet, la démarche éthique et l'application du principe des 3R sera envisagée comme suit:
Remplacer : La carcinogenèse hépatique est un processus impliquant différents types cellulaires au sein du foie. Les lignées hépatocytaires tumorales humaines ne permettent pas de reproduire tout ce processus. L'utilisation de modèle animaux n'est donc pas pour l'instant remplaçable dans ce type d'études.

Raffinement : A ce jour, la plupart des modèles animaux de NASH, sont des modèles de souris. Or la souris n'est pas capable de développer une cirrhose décompensée. Ce n'est donc pas un modèle animal qui reproduit la pathologie humaine. La fibrose et/ou la cirrhose modifient la vascularisation hépatique, la composition de la matrice extracellulaire et le métabolisme des médicaments. Par conséquent, il est essentiel d'utiliser un modèle animal avec CHC sur fond de NASH et également dans le contexte de Fibrose/Cirrhose qui nous permettra ensuite d'étudier, dans des tests précliniques futurs, l'efficacité des molécules thérapeutiques sur la régression des tumeurs et/ou la prévention du développement tumoral, mais aussi la tolérance du traitement. Dans notre laboratoire, nous travaillons depuis plusieurs années sur un modèle animal de rat permettant de mimer au mieux la pathologie humaine de développement tumoral hépatique sur fond cirrhotique (rats DEN). Dans

le présent travail, nous nous proposons de faire évoluer ce modèle pour qu'il associe une NASH avec la cirrhose et le cancer. La NASH sera induite par un régime alimentaire riche en sucres et en lipides (western diet). Nous caractériserons en profondeur ces nouveaux modèles de rats afin de déterminer la prédominance du CHC, de la fibrose et de la NASH. Cette approche représente un raffinement essentiel des modèles in vivo de carcinogenèse hépatique. Le raffinement des 3R s'étend donc au-delà de ce projet avec un impact fort sur la méthodologie à venir et la transposition des résultats à l'homme. L'utilisation d'anesthésiant et/ou analgésique sera réalisée suivant les procédures afin de réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse.

Réduction : Ces mise au point de modèle permettra de nous préparer pour des études précliniques ultérieures avec le meilleur modèle et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisé dans les phases précliniques. De plus, un calcul des effectifs nécessaires basé sur une variable biologique simple (incidence de CHC) nous permettra d'atteindre une significativité des résultats avec un minimum d'animaux. Notre approche statistique est basée sur la comparaison de deux moyennes.

220 rats seront nécessaires pour cette version de l'étude.

12337 La cardio-oncologie connaît actuellement un essor grandissant au regard du problème de santé publique. En effet, ceci est dû au vieillissement de la population, l'augmentation de cas de cancer et la mise sur le marché de nouvelles molécules anticancéreuses. La mise en place de partenariat entre les cliniciens et la science fondamentale est actuellement en plein développement avec la demande des cliniciens de nouveaux modèles in vivo de cardio-oncologie, de nouvelles stratégies de cardioprévention. Actuellement il existe une seule molécule cardioprotectrice et son autorisation est réduite chaque année pour cause d'effets secondaires importants.

L'objectif général scientifique de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires liés à la cardiotoxicité et d'identifier les différences de sensibilité cardiovasculaire aux traitements anti-cancéreux (notamment aux anthracyclines qui sont des agents couramment utilisés en chimiothérapie) en fonction des patients. Une attention particulière sera portée aux modifications des voies de signalisation cellulaires.

L'objectif est dans un premier temps d'approfondir nos connaissances des mécanismes de la cardiotoxicité des anthracyclines et dans un second temps de proposer à plus long terme des thérapies plus ciblées ou d'identifier des biomarqueurs spécifiques précoces signant le développement d'une cardiomyopathie. Enfin le dernier objectif sera d'apporter des possibilités de prévention de ces effets indésirables des anthracyclines. A ce titre, une cardioprotection prometteuse pourrait être confirmée in vivo au sein de notre laboratoire en regard des données cumulées initialement in vitro. Un maximum de données a été collecté au préalable afin de s'assurer du bien fondée de l'étude in vivo.

L'aspect éthique est étroitement lié à cette étude. En effet, ce projet est mené dans le cadre d'une réflexion de respect et d'épargne de l'animal avec une concertation et discussion inter équipe et un retour d'expérience sur des projets déjà menés au laboratoire. Une étude sur le genre a par exemple déjà été réalisée au sein de l'unité avec comme modèle de stress l'utilisation de la Doxorubicine (anthracycline). Le nombre d'animaux a été volontairement limité au strict nombre nécessaire à la puissance de l'étude et aux critères in vivo habituels et comparaison avec les études antérieures. Concernant l'aspect technique, le protocole d'utilisation a été optimisé et la dose d'utilisation de Doxorubicine choisie est faible.

Une attention toute particulière a été apportée au point critique de l'étude à savoir les modèles in vivo alliant à la fois le modèle de cardiotoxicité à la Doxorubicine et l'induction d'un cancer. Ces modèles sont absolument nécessaires à la bonne compréhension de la cardio-oncologie et sont ardemment demandés par les cliniciens pour une question de pertinence. Ce modèle de pathologie onco-cardiologique présente en effet l'unique solution pour l'observation et la compréhension d'une réponse intégrée globale (immunitaire, hormonale, réponse adaptative au niveau des organes tels que le cœur, les reins...) ainsi que la relation cœur-tumeur et l'effet des traitements thérapeutiques associés à l'un et l'autre. L'ensemble étant extrêmement méconnu.

Les protocoles d'observation choisis sont le moins invasif possible avec des analyses par échocardiographie sur animaux anesthésiés. Les études réalisées sont longitudinales afin de cumuler sur un même animal un maximum d'information et de prélèvements. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques si besoin.

En fin d'expérimentation, les animaux seront sacrifiés et les tissus prélevés de ces animaux seront prélevés afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés en obtenant beaucoup d'informations. Les animaux feront l'objet d'un suivi rapproché afin d'éviter toute souffrance liée aux diverses complications de l'étude. Enfin, les cages des animaux seront enrichies et les animaux seront suivis par un personnel spécifiquement formé. Le nombre total de souris utilisées sera de 280 sur l'ensemble de l'étude.

12338 La consommation excessive d'alcool est la première cause de cirrhose en France. L'atteinte du foie (atteinte hépatique) débute par une accumulation de gouttelettes lipidiques (triglycérides) dans les cellules du foie appelée stéatose. Durant l'abus d'alcool, cette stéatose peut évoluer vers une inflammation du foie appelée hépatite alcoolique. La maladie peut ensuite évoluer vers la fibrose (stade auquel les cellules du foie ne se régénèrent plus et où un tissu cicatriciel apparaît) puis la cirrhose et jusqu'au cancer du foie. La mortalité des formes sévères de l'hépatite alcoolique est comprise entre 50 et 75%. La corticothérapie est le seul traitement qui peut améliorer le pronostic à court terme. Ainsi, parmi les sujets ayant une forte consommation d'alcool à long terme, la majorité des patients développent une stéatose, mais seulement 10 à 35% développeront une hépatite alcoolique et 8 à 20% évolueront vers la cirrhose. D'autres facteurs que la seule consommation excessive d'alcool interviennent dans la genèse des lésions hépatiques. La recherche de facteurs qui relient consommation d'alcool, nature et progression des lésions hépatiques est donc essentielle pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques améliorant la prise en charge de ces formes graves. Il a récemment été démontré que le microbiote intestinal (bactéries présentes dans notre tube digestif) participe à la survenue des lésions hépatiques au cours de l'alcoolisation et que la composition du microbiote influe donc sur la sévérité des lésions du foie dans l'alcoolisme chronique. Il a récemment été montré que modifier le microbiote intestinal en ajoutant de la pectine dans le régime alimentaire des souris permettait de prévenir l'apparition des lésions hépatiques. Il a également été montré que la pectine était capable, non seulement de prévenir, mais également de réverser les dommages hépatiques liés à l'alcool. L'épithélium intestinal a un rôle prépondérant dans les effets protecteurs de la pectine ainsi que la sécrétion de peptides anti-microbiens. Les données actuelles ont permis de mettre en évidence l'activation de la voie du récepteur aux hydrocarbures aromatiques, AhR, dans les effets protecteurs de la pectine.

L'objectif de ce projet est d'identifier les mécanismes d'action par lesquels la pectine exerce son effet protecteur vis-à-vis des lésions hépatiques au cours de la maladie alcoolique du foie en se focalisant sur la voie AhR. Dans un premier temps, la voie AhR sera modulée par l'utilisation d'activateur ou d'inhibiteur afin de voir s'il est possible de mimer les effets de la pectine ou au contraire les bloquer dans un modèle murin de maladie alcoolique du foie. Dans un second temps, des souris déficientes en AhR de manière tissu spécifique seront utilisées pour identifier le (ou les) type(s) cellulaire(s) impliqués dans les effets protecteurs de la pectine.

Les complications hépatiques observées au cours de la maladie alcoolique du foie mettent en jeu des interactions entre les différents organes qu'il est actuellement impossible de reproduire in vitro. Il nous faut étudier l'effet de l'alimentation en particulier l'alcool sur les bactéries intestinales, l'effet de ces bactéries sur la barrière intestinale et au final l'impact de cette atteinte sur le développement des lésions du foie. Le seul modèle auquel nous pouvons avoir recours est l'animal (Remplacement). Le rongeur, ici la souris, partage bon nombre de processus cellulaires avec l'Homme et un modèle d'alcoolisation permet de reproduire les premières étapes de la maladie humaine.

Nous tenons compte de la règle des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement) au cours de nos différentes procédures. Nous avons défini des points limites qui permettent d'évaluer l'arrêt du protocole pour l'animal en souffrance en particulier concernant le taux d'alcoolisation. Pour chaque procédure et durant toute la période d'hébergement, nous veillons au bien-être animal. Cependant

l'enrichissement classiquement utilisé étant en cellulose et ayant un impact sur le microbiote intestinal, nous utilisons des enrichissements en plastique dur et la quantité de sciure dans la cage est augmentée afin de permettre aux animaux un enfouissement suffisant. Au total ce projet nécessite l'utilisation de 928 souris, nombre d'animaux qui est réduit au minimum, mais suffisant pour pouvoir faire des comparaisons et des statistiques exploitables.

12339 L'extinction de l'expression des gènes grâce à l'utilisation des petits ARN interférents (siRNA) est une technique très puissante utilisée déjà depuis plusieurs années et devenue d'usage assez commun pour l'expérimentation in vitro. Depuis cette découverte, beaucoup des protéines (du moins leur ARN messenger) associées à diverses pathologies ont été ciblées par des siRNA et plusieurs essais cliniques sont aujourd'hui en cours. Dans le cas des maladie hémorragiques une molécule est en phase III pour le traitement des hémophilies A et B.

Un des avantages majeurs de l'utilisation des siRNA est la très grande spécificité d'action et le fait que théoriquement chaque ARN représente une cible potentielle. Parmi les difficultés principales qui ont ralenti la mise sur le marché des molécules thérapeutiques basées sur l'utilisation des siRNA, on peut citer la difficulté d'atteindre de manière efficace les tissus ou les cellules d'intérêt.

Récemment des réactifs utilisables en administration systémique et permettant de cibler les siRNAs vers les hépatocytes ont été développés pour les modèles murins.

Le but de ce travail est de produire des modèles murins de maladie de Willebrand associées à des mutations spécifiques par la technique du transfert de gènes et ensuite de tester la faisabilité d'un traitement basée sur l'utilisation de siRNAs. La maladie de Willebrand représente la maladie hémorragique congénitale la plus fréquente et elle est associée à la présence de mutations sur le gène du FW. Cette maladie représente donc un candidat idéal pour un traitement basé sur l'interférence par ARN.

Nous proposons de combiner la technique du transfert des gènes par injection hydrodynamique pour développer dans un premier temps les modèles murins de maladie de Willebrand et dans un second temps d'administrer des siRNAs spécifiques pour en tester le potentiel thérapeutique. Ceci est possible parce que, suite à l'injection hydrodynamique, les protéines d'intérêt sont exprimées par les hépatocytes et que l'approche siRNA va permettre d'aller justement cibler ces cellules.

Nous allons donc injecter de l'ADNc codant pour du FW (avec différentes mutations) afin de générer des modèles murins transitoires de maladie de Willebrand. Une fois ces modèles validés, les souris seront traitées avec des siRNAs conçus pour éteindre spécifiquement l'expression du gène muté sans affecter l'expression du gène normal.

Des modèles cellulaires ont déjà été utilisés afin de sélectionner les siRNA le plus spécifiques et les plus efficaces in vitro afin de limiter le nombre d'animaux à utiliser. Toutefois leur efficacité de correction in vivo reste un point crucial à tester. Le FW est une protéine qui circule dans le plasma et dont la fonction en hémostase ne peut pas être modélisée in vitro puisque c'est la tendance hémorragique des animaux traités qui devra être mesurée. Ces arguments justifient notre utilisation de modèles animaux.

Le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) a été une préoccupation constante dans la préparation du protocole de notre étude et toutes les procédures ont été conçues pour le respecter. La mise en œuvre des études préliminaires pour bien valider les modèles pathologiques permettra de raffiner la procédure suivante d'un part pour bien décider les temps d'observation et d'autre part pour réduire le nombre des souris soumis au traitement avec siRNAs. On estime donc que 339 souris représente le maximum des souris nécessaires pour l'ensemble des procédures. Ce nombre pourra être réduit en fonction des résultats obtenus dans les expériences pilotes. Dans le cas, peu probable, que les études préliminaires ne permettent pas de valider les modèles pathologiques, l'étude sera arrêtée avant la mise en œuvre de la procédure concernant le traitement avec siRNAs. Tout sera mis en œuvre pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux utilisés. Nous adapterons la procédure en tenant compte des points limites à ne pas dépasser, en particulier une éventuelle perte de poids de l'animal ou un comportement indicateur d'une souffrance quelconque. Les souris sont placées en cage avec 3-4

animaux/cage dans des portoirs ventilés. Aucune souris isolée n'est admise dans nos protocoles. Pour le bien-être des animaux, une litière mélangée est utilisée et le milieu est enrichi par l'ajout de « sizzle nest » et de petits blocs en bois à ronger. Les souris recevront nourriture et boisson ad libitum.

12340 Ce projet de recherche a pour objectif d'étudier les fonctions auditives et vestibulaires d'une souche de souris mutante ne possédant pas un gène spécifique (1500015O10Rik) qui pourrait être impliqué dans des atteintes de l'audition et de l'équilibration. La démarche proposée consiste à enregistrer les potentiels évoqués auditifs (ABR), ainsi que le comportement lié aux fonctions posturo-locomotrices selon la méthode récemment détaillée, et le potentiel évoqué vestibulaire (VsEP) de ces souris nommées Augurin-/- . Le but du projet est d'évaluer plus précisément l'ampleur des atteintes de l'audition et de l'équilibration produites par l'absence de ce gène. Des analyses histologiques des tissus de l'oreille seront entreprises afin d'identifier les supports structurels des atteintes fonctionnelles repérées. Pour cela les cochlées et vestibules des animaux seront prélevés et analysés selon la méthode précédemment détaillée. Le nombre total de souris utilisées est de 78.

L'évaluation des conséquences directes de la délétion du gène de l'augurine, ne peut être réalisé que sur modèle animal permettant une évaluation des fonctions auditives et vestibulaires. Cependant afin d'appliquer la règle des 3Rs les mêmes souris seront utilisées successivement pour les quatre étapes du projet au lieu d'utiliser des souris différentes pour chaque procédure. Afin de réduire la douleur pouvant être occasionnée dans les procédures 2,3 et 4, les souris seront anesthésiées et un sédatif sera administré. Un antalgique sera administré avant le réveil des animaux. En post-opératoire, les souris seront hébergées individuellement afin d'éviter l'arrachement des plots craniens.

12341 Au cours d'une infection l'activation de senseurs de l'immunité innée, dont les inflammasomes, donne lieu au déclenchement d'une réponse inflammatoire permettant de combattre et de stopper l'infection. Cependant, l'inflammation mal contrôlée peut devenir délétère pouvant aller jusqu'à la mort du patient. Un nombre croissant d'étude souligne le rôle de l'inflammation chronique, et notamment de l'inflammasome NLRP3 dans la pathogénèse de plusieurs maladies inflammatoires stériles. Les cristaux de MSU (monosodium urate) sont formés suite à une accumulation d'acide urique au niveau des articulations, ils sont reconnus par des récepteurs au niveau de la membrane cellulaire qui permet l'activation de l'inflammasome NLRP3, cette activation va induire le recrutement de neutrophiles inflammatoires au niveau du site de l'inflammation. Les cristaux de Silice entre dans la composition de nombreux minéraux, utilisés dans un modèle in vivo, ils sont capable (comme le MSU) d'activer NLRP3 et d'induire un recrutement des cellules immunitaires. Ce modèle constitue un modèle de choix pour l'étude de la voie des inflammasomes in vivo.

L'objectif de ce projet est d'identifier et de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régulant l'inflammation afin de pouvoir les cibler dans de nouvelles approches thérapeutiques. Nous avons déterminé que 336 souris maximum sont nécessaire pour mener ce projet à son terme.

Pour réduire la douleur des animaux lors de la procédure, les souris se verront administrées un analgésique : Buprecare, 30 minutes avant l'injection des cristaux.

Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations ont été mises au point avec des points limites suffisamment prédictifs pour respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et ainsi permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal, les études in vitro ne nous permettant pas de reproduire les mécanismes de l'inflammation étudiés dans ce projet.

12342 Le Syndrome de Chudley McCullough (CMCS) est une maladie rare (1/1.000.000) qui se caractérise par une surdité sévère, précoce et complexe associée à des anomalies cérébrales sévères.

Le CMCS semble être la conséquence de mutations du gène GPSM2 (G Protein Signaling Modulator 2), sans que l'on connaisse les bases moléculaires de cette pathologie. Pour mieux

comprendre les mécanismes moléculaires associés au CMCS, l'étude chez l'animal est indispensable.

Nous avons généré deux modèles murin du CMCS, deux lignées de souris mutante pour le gène GPSM2, mimant les symptômes observés chez l'homme à la fois dans l'oreille interne et le système nerveux.

Notre objectif pour ce projet est de restaurer les déficits auditifs par injection virale intra-cochléaire chez nos souris transgéniques. Cette étude qui sera réalisée sur 5 ans comprendra des études histologiques et comportementales.

Règle des 3R. Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. Raffiner: Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage collective enrichie et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place. Les animaux sont opérés sous anesthésie générale et locale. La procédure chirurgicale a été validée par notre vétérinaire référent et un suivi post-opératoire est mis en place pendant le 48h qui suit l'acte chirurgical. Réduire: Pour de réduire le nombre d'animaux qui seront mis en reproduction, nous utiliserons à la fois les bébés mâles et femelles issus des croisements. <Pour n'utiliser que le nombre minimal d'animaux tout en garantissant la validité scientifique et statistique des résultats 12 animaux sont nécessaire pour chaque condition expérimentale. Nous utiliserons dans ce projet deux lignées de souris transgéniques à trois stades de développement. Sur ces animaux deux études histologique différentes seront réalisées à tous les stades. Les tests auditifs seront réalisés uniquement chez l'adulte.

Notre projet portera donc sur 1 lot de souris et nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à maximum 288 animaux sur 5 ans.

12343 Notre sujet de recherche (fondamentale) est orienté vers l'étude des mécanismes contrôlant le développement du cerveau chez l'embryon. En particulier, l'objectif principal de notre travail est de mieux comprendre, au cours de ce processus complexe de développement, les mécanismes nécessaires à l'établissement et au maintien de la morphologie cellulaire et à l'organisation intracellulaire des composants de la cellule. Des mutations dans des gènes importants pour ces processus sont associées à des pathologies du système nerveux tel que l'épilepsie ou la microcéphalie (cerveau plus petit). Ici nous souhaitons comprendre comment ces gènes régulent le développement du cerveau. Ainsi nous pourrions améliorer notre compréhension des mécanismes soutenant l'apparition dans ces maladies chez l'homme.

Le développement du cerveau a été bien décrit chez les rongeurs et est très proche du développement humain. Dès lors, ce modèle est le plus adapté pour répondre à notre question biologique. De plus, aucun modèle d'expérimentation in vitro ne peut mimer ou refléter toute la complexité des phénomènes ayant lieu dans le cerveau en développement telle que la migration des neurones.

Nous avons notamment identifié une protéine clé pour la migration neuronale au cours du développement du cerveau. Nous poursuivons désormais nos travaux par l'étude des effets de la perte de fonction de ce gène dans un contexte plus physiologique. L'étude du modèle murin n'exprimant plus du tout notre gène d'intérêt a permis de confirmer que ce gène est essentiel à la morphogénèse cérébrale chez les souris âgées de 16 semaines. Nous observons de graves malformations cérébrales, notamment une taille plus petite du cerveau et une absence de connectivité entre les hémisphères droit et gauche du cerveau. Fait intéressant les défauts varient selon le sexe de la souris.

Ici, notre objectif de déterminer quelles sont les conséquences de ces défauts neuroanatomiques sur le comportement des souris. Nous utiliserons ce modèle murin n'exprimant plus du tout notre protéine motrice d'intérêt pour réaliser ces études comportementales. Ceci sera fait en parallèle avec des études moléculaires et cellulaires qui visent à découvrir les mécanismes par lesquels notre

protéine motrice d'intérêt régule la taille et la connectivité du cerveau. À noter, nous avons validé le modèle et déterminé que notre protéine d'intérêt est totalement absente dans le cerveau de notre modèle.

Le nombre total d'animaux utilisé dans ce projet est estimé à 90 souris. Pour réduire le nombre d'animaux et éviter tout doublon, les mêmes animaux seront utilisés pour réaliser les tests comportementaux et tester la susceptibilité à l'épilepsie. Cette expérimentation animale est rendue nécessaire pour nos travaux en regard de la complexité de la maturation corticale qui ne peut être recréée par des approches *in vitro*. Toutefois, nous gardons à l'esprit notre responsabilité de diminuer au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en garantissant la pertinence statistique. Nous prendrons en compte avec la plus grande attention le bien-être de nos animaux. La reproduction et l'élevage de nos animaux se font dans un environnement contrôlé permettant une réduction du stress pour l'animal. Nous limiterons le temps de manipulation à 45 minutes sur animal anesthésié. Après la chirurgie, l'animal est placé dans une cage chauffée à 35° et est surveillé jusqu'au réveil complet et pour gérer toute éventuelle complication. Un anti-inflammatoire non-stéroïdien (Métacam) est ajouté à l'eau du biberon pendant 2 jours après la chirurgie. L'objectif est de prévenir toute douleur ou détresse.

12344 Pour bien comprendre les effets d'une infection parasitaire par le nématode sur notre santé et notre immunité, il est essentiel d'utiliser un modèle expérimental tel que le *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) pour définir en profondeur les conséquences biologiques d'une infection.

Ce parasite présent dans la nature, infecte les rongeurs. Son cycle de vie est bien connu : Les œufs situés dans les sols ou les excréments d'animaux infectés permettent de libérer des vers qui peuvent infecter des animaux par contact cutané. Une fois à l'intérieur de l'hôte, ils circulent d'abord dans système pulmonaire ; où ils irritent les voies respiratoires supérieures et déclenchent une réponse immunitaire, puis les intestins dont ils se nourrissent et où ils pondent leurs œufs, qui sont ensuite excrétés.

Dans cette étude, nous examinons la réponse de l'hôte à l'exposition cutanée, au parasite ou à ses produits, en évaluant la réponse immunitaire innée, la réponse immunitaire adaptative, et l'exposition par la mère lors de l'allaitement. Dans ce projet nous allons analyser les modifications de l'immunité en utilisant des souris C57BL/6 et des souris transgéniques telles que des souris immunodéficientes pour différents gènes comme RAG, MyD88, ChAT, RORa et RORc, IL-22 et IL-17, ainsi que les souris rapporteurs ChAT et ROR GFP. Ces gènes sont impliqués dans différentes voies de signalisation, ce qui pourra nous permettre d'appréhender les mécanismes d'action importants dans la survie ou l'expulsion des parasites de l'organisme. Selon les résultats, d'autres animaux transgéniques pourront être utilisés afin d'étudier d'autres voies de signalisation. Les lignées indiquées ne présentent pas d'immunodéficiência forte ; cependant les souris déficientes sont plus susceptibles aux pathogènes et sont maintenues dans un environnement avec un statut sanitaire de type EOPS (Exempt organismes pathogènes spécifiques).

Nous souhaitons identifier les populations de cellules importantes pour combattre ces parasites et connaître, au final, les molécules importantes sécrétées par ces cellules pour protéger l'hôte. Pour cela, des techniques de cytométrie en flux pour identifier les populations cellulaires, d'histologie pour visualiser les dommages créés par les parasites ainsi que différents dosages seront nécessaires pour caractériser au mieux les mécanismes de défense des animaux suites à l'infection par *Nippostrongylus brasiliensis*.

Pour obtenir les vers nécessaires à l'étude, des rats seront utilisés en tant que porteur. Les fèces de ces rats seront récupérées afin d'extraire les vers et de pouvoir les injecter aux souris.

L'animal utilisé pour les études est la souris C57BL/6. L'administration du parasite se fait par injection sous cutanée de larves Nb (max. 500) dans le dos. Le passage des parasites dans le système pulmonaire induit d'abord une inflammation chez la souris avec l'induction des symptômes de type asthme (résistance pulmonaire, production de mucus, recrutement de cellules immunitaires...). Ces paramètres induisent des symptômes cliniques discrets visibles entre 2 et 4

jours d'infection, se traduisant par une légère perte de poids. Les souris mettent en place une immunité rapide et produisent moins d'œufs ce qui évite une surinfection des animaux.

Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra des réponses et la disponibilité des souris. Le projet pourra comporter jusqu'à 40 études. Une étude comportera jusqu'à 30 animaux. 1200 souris seront nécessaires sur 3 ans. De plus, pour perpétuer la survie des vers, des rats seront nécessaires à raison de 2 rats toutes les six semaines, cela fera 48 rats sur 3 ans. 1248 rats et souris seront donc nécessaires pour ce projet sur 3 ans.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester la réponse immunitaire de l'hôte. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. De plus, ils sont hébergés par 5 souris maximum par cage de type II, et 2 rats maximum en cage de type 3. Dans un souci de bien-être des animaux, une anesthésie légère pourra être utilisée pour réaliser les injections des parasites. De plus, une surveillance des animaux est réalisée quotidiennement et consiste en l'observation de l'aspect général de l'animal, de son comportement et de sa mobilité. Une prise de poids est réalisée 1 fois par jour. Si des animaux présentent des signes de souffrance atteignant le point limite : perte de poids supérieure ou égale à 20% et/ou score de 4 (décrit en paragraphe 3.4.13), ils seront mis à mort. Les analgésiques ne sont pas administrés car ils peuvent influencer les résultats expérimentaux, et ils peuvent interférer avec le système immunitaire.

Réduction : le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

12345 Le syndrome de Costello (CS) apparaît dans les premiers mois de la vie et se caractérise par un retard de croissance postnatale, des traits épais, un déficit intellectuel et des altérations au niveau de la peau, des muscles et du cœur. Environ 60% des malades souffrent de troubles cardiaques responsables du décès de nombreux enfants.

Notre objectif est d'élucider les mécanismes responsables du syndrome de Costello causés par une mutation dans le gène HRAS, et d'apporter des solutions thérapeutiques pour limiter le développement de troubles cardiaques chez le jeune enfant et chez l'adulte. Pour atteindre ces objectifs de recherche fondamentale et médicale nous disposons d'un nouveau modèle murin de la maladie. Ce modèle a fait l'objet d'une première analyse qui a révélé une hypertension associée à une accélération du rythme cardiaque et le développement de troubles de la fonction du cœur. La souris mutée présente aussi une faiblesse musculaire généralisée et des anomalies au niveau du métabolisme énergétique.

Ce projet vise donc à étudier en détail les mécanismes responsables des troubles cardiaques et musculaires dans la souris modèle du syndrome de Costello, ainsi qu'à les réduire à l'aide d'un médicament déjà autorisé chez l'homme dans le traitement de l'hypertriglycéridémie. Ce médicament rétablit aussi certains défauts du métabolisme énergétique comme ceux observés dans la souris modèle du syndrome de Costello dans notre laboratoire. Afin de progresser vers le repositionnement de cette molécule dans le traitement des troubles cardiaques dans le syndrome de Costello nous devons évaluer son action sur un modèle de la maladie (in vivo). Pour cela, le modèle murin du syndrome de Costello dont nous disposons est indispensable et parfaitement adapté à nos besoins.

Remplacement :

Le modèle Souris permet d'étudier de manière complète le système cardiaque, tel qu'il peut être affecté chez l'Homme. Nous ne pouvons pas réaliser ce type d'étude dans des modèles in vitro ou in silico, car la complexité du système cardiaque n'est actuellement pas reproduite par ces outils. Il est donc indispensable de travailler sur un modèle murin car la cardiomyopathie est une maladie d'adaptation du cœur au sein d'un organisme,

Réduction :

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences un total de 3 lots de 40 animaux, soit 120 souris. Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. Par ailleurs, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les 2^e et 3^e cohortes d'animaux transgéniques ne seront générées que si la 1^{ere} cohorte démontre un effet protecteur du traitement vis-à-vis des anomalies cardiaques.

Raffinement :

Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort. Pour cela un suivi quotidien sera réalisé par le personnel de l'animalerie et un enrichissement des cages sera proposé à l'aide de nids afin de réduire le stress et satisfaire les instincts naturels de la souris. Les souris seront hébergées en cages ventilées et suivies quotidiennement pour détecter d'éventuels signes cliniques. Durant les procédures expérimentales, tous les efforts seront entrepris pour minimiser le stress encouru, pour limiter la douleur et la contrainte qu'elles imposeront aux animaux avec un recours à l'analgésie et/ou l'anesthésie ainsi qu'à des temps de récupération entre chaque procédure permettant d'éviter un effet cumulatif.

Notre projet prend en compte le respect des animaux et la participation aux conditions d'enrichissement dans les cages.

Ce projet s'inscrit donc dans une recherche thérapeutique contre les maladies rares avec des implications à plus long terme en santé humaine.

Ce projet a été préalablement évalué par les instances scientifiques de l'ANR qui l'ont financé. La présente saisine comporte ainsi des implications à la fois sur le plan fondamental pour la compréhension du rôle biologique du gène HRAS mais aussi en santé humaine dans le cadre des maladies rares et de leur traitement.

12346 Avant toute commercialisation d'un médicament humain et vétérinaire/produit chimique/vaccin, il faut évaluer ses effets indésirables à des doses élevées. Les études toxicologiques ont pour but la détection de ces effets après administration unique puis répétée. La réglementation internationale requiert l'utilisation en recherche biomédicale d'une espèce non rongeur et rongeur. Chez ces mammifères (rats, souris, cochon d'Inde, Hamster...), on évalue les effets après un (effets aigus) ou plusieurs jours de traitement dont la durée varie en fonction de celle souhaitée/possible chez l'Homme. Pour les produits chimiques, le niveau de danger et de risque peut être associé directement aux résultats de ces études.

Ce projet (pour lequel il n'existe pas d'alternative in vitro) se résume en l'administration unique ou répétée (quotidiennement) d'un produit pharmaceutique/chimique chez le rongeur pour une durée de 1 jour à 1 année. La voie d'administration est celle utilisée chez l'homme (orale, nourriture, sous cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intra articulaire, dermale...) pour les médicaments, ou la voie de contact possible pour les produits chimiques. Dans certaines études cutanées, les animaux peuvent être sensibilisés par l'application d'un patch. Des points limites sont définis de façon à éviter tout inconfort ou souffrance prolongée. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance est jugée trop importante et si aucun soin ne peut être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptable.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet peut être estimé à 40000 sur 3 ans. Il doit permettre d'obtenir des résultats représentatifs, prédictifs d'une toxicité, et exploitables statistiquement pour d'atteindre les objectifs des études. Le nombre d'animaux est déterminé à minima afin d'obtenir des résultats robustes statistiquement et ainsi atteindre les objectifs de l'étude. Parfois, des animaux suivent une phase sans traitement à l'issue d'une période de traitement afin d'évaluer la réversibilité

des effets, et/ou font l'objet de prélèvements sanguins pour définir le profil cinétique de la molécule/métabolites.

Si nécessaire, l'administration du composé à tester est pratiquée sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur (par exemple voie intra articulaire). Des souris transgéniques peuvent être utilisées.

L'hébergement (en groupe par défaut) des animaux en cages est conforme à la Directive 2010/63 avec enrichissement.

Les paramètres vivo sont enregistrés méthodiquement (par exemple les signes cliniques, poids corporel, consommation alimentaire, ophtalmologie) et des analyses hématobiochimiques et urinaires sont réalisées. Des prélèvements sanguins permettent d'établir un profil toxicocinétique. Après euthanasie, l'étude histopathologique (examen macroscopique et microscopique, pesée des organes majeurs) permet d'identifier une toxicité d'organes.

12347 Les chèvres sont particulièrement sensibles aux parasites gastro-intestinaux, qu'elles ingèrent en broutant au pâturage. Pour prévenir le risque d'infestation à l'herbe et pour des contraintes pratiques liées à l'exploitation laitières, les chèvres sont généralement maintenues en bâtiment sans accès au pâturage. Afin de revenir à un mode d'élevage à l'herbe, plus en phase avec les besoins physiologiques des animaux il est nécessaire de disposer de moyens de gestion du parasitisme durables. L'usage des vermifuges classiquement disponibles est restreint en production laitière et les strongles gastro-intestinaux deviennent résistants à ces molécules. En complément de ces vermifuges, des extraits de plantes sont disponibles et utilisés par les éleveurs sans que l'efficacité de ces spécialités ne soit connue.

Dans le cadre de notre projet, nous souhaitons évaluer l'efficacité de deux produits du commerce contre l'infestation parasitaire chez des chèvres en lactation. Les essais se feront par infestation expérimentale de deux lots de 15 chèvres (lot témoin infeste et non traite, lot infeste et traite) pour chaque produit (60 chèvres utilisées au total).

Réduction: le nombre d'animaux est calculé pour pouvoir mettre en évidence des effets modérés à fort, sur la base d'expérience précédente. Les produits testés sont issus d'un criblage in vitro.

Raffinement: les animaux sont conduits en lot, et gérés par du personnel qualifié. La dose infectante est limitée pour démontrer des effets tout en minimisant l'impact sur le bien-être des chèvres.

Remplacement: il n'existe pas de méthode de culture des parasites adultes in vitro. De plus notre étude vise à reproduire les situations d'élevage.

12348 La demande d'autorisation concerne des travaux pratiques (TP) de nutrition dispensés à des étudiants Master 1 de deux cursus différents dont l'expérimentation d'animalerie est réalisée en amont. L'expérimentation animale consiste à étudier l'effet de régimes alimentaires donnés pendant 3 semaines sur le métabolisme lipidique chez le rat Sprague Dawley (30 animaux), après une semaine d'acclimatation. Les régimes alimentaires sont réalisés au laboratoire à partir des besoins nutritionnels connus pour le rat en croissance. Seule la composition lipidique des 3 différents régimes change : régime lipidoprive (sans lipide), régime complétement en huile d'arachide (oméga-6), régime complétement en huile de lin (oméga-3). Les étudiants démarrent leur TP sur tissus congelés après la mise à mort des animaux et le prélèvement ainsi que le stockage des tissus réalisés par l'équipe du laboratoire. Les tissus prélevés à la suite de cette expérimentation permettent de créer un stock d'échantillons biologiques congelés (foie, cerveau, tissu adipeux) nécessaire pour 3 années de TP environ, durée dépendante du nombre d'étudiants inscrits. Les résultats sont ensuite analysés statistiquement pour différencier les métabolismes lipidiques distincts associés à chaque régime.

Ce projet se base sur la règle des 3R dans sa démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale.

Remplacement : Il n'est pas possible de remplacer le modèle in vivo pour cette étude nutritionnelle faisant intervenir des métabolismes complexes multi-organes interdépendants.

Réduction : La mise en place du TP sur tissus congelés permet de réduire le nombre d'animaux utilisés pour ces TP en réutilisant d'une année sur l'autre les tissus prélevés sur les mêmes animaux tout en permettant une analyse statistique des résultats par promotion.

Raffinement : La semaine d'acclimatation, la procédure d'anesthésie à l'isofurane et d'analgésie à la xylazine ainsi que la non-utilisation de procédures invasives entraînent le raffinement de l'expérimentation. Aucun des régimes donnés aux animaux n'est toxique.

12349 Ce projet a pour but d'étudier les conséquences de l'exposition périnatale aux cannabimimétiques sur le développement neurologique dans un modèle de rats. Spécifiquement nous voulons identifier les effets cellulaires synaptiques et comportementaux de l'exposition aux cannabimimétiques durant l'allaitement. Dans ce but le projet consiste au traitement de rates allaitantes par des cannabimimétiques (synthétique ou naturel) et au suivi comportemental et synaptique de petits des deux sexes de P9 jusqu'à l'âge adulte. Cette étude a pour objectif la compréhension moléculaire des déficits comportementaux associés à l'exposition périnatale au cannabis. Bien que l'usage périnatal de cannabis a été associé à des troubles neurodéveloppementaux dans la progéniture, le ou les mécanismes sous-jacents restent incomplètement compris

La consommation de marijuana est répandue chez les femmes en âge de procréer, allant de 1 à > 5%, en fonction de la population concernée. Environ 80% des utilisatrices pendant la grossesse continue pendant l'allaitement. Les cannabimimétiques consommés par les mères allaitantes atteignent le nouveau-né pendant l'allaitement. À 1 an, les nourrissons exposés à la marijuana pendant l'allaitement obtiennent un score médiocre de développement psychomoteur par rapport à ceux non exposés. On estime ainsi qu'avec environ 4 millions de naissances aux États-Unis en 2015, 40 000 nourrissons ont été exposés à une exposition importante aux cannabimimétiques (in utero ou via le lait maternel) au cours de la période périnatale.

Dans le but d'identifier les conséquences moléculaires, fonctionnelles et comportementales de l'exposition des mères aux cannabinoïdes pendant l'allaitement sur la progéniture des deux sexes, notre étude a deux objectifs succ essifs.

Objectifs 1. Caractérisation des effets précoces :

Le changement de la polarité du récepteur de l'acide gamma amino butyrique (GABA) A d'un effet global exciteur à inhibiteur est crucial pour le développement normal des circuits corticaux et des comportements associés. Ce changement est principalement dû à l'augmentation de l'expression d'un co-transporteur potassium / chlorure, KCC2, qui extrude le chlore intracellulaire. Nous voulons caractériser les conséquences sur les circuits neuronaux du cortex préfrontal et de l'accumbens, déterminer les mécanismes par lesquels les cannabinoïdes retardent l'expression de KCC2, examiner les niveaux des composants du système endogène cannabinoïde et mesurer des comportements des jeunes rats des deux sexes (vocalisations ultrasoniques et retour au nid) après exposition maternelle aux cannabimimétiques.

Objectif 2. Déterminer si l'exposition pendant l'allaitement a des effets durables sur la plasticité synaptique chez l'adulte, sur les niveaux d'expression des composants du système endogène cannabinoïde, sur les comportements sociaux et les fonctions cognitives

Réduction, Raffinement & Remplacement : Les animaux sont utilisés pour obtenir de MULTIPLES valeurs afin de Réduire (R) de manière maximale le nombre d'animaux et de Raffiner (R) les protocoles. Typiquement, chaque rat sera testé au niveau comportemental en combinant plusieurs tests comme indiqué. Puis : Option 1, les mêmes animaux seront sacrifiés, plusieurs structures cérébrales disséquées pour les mesures biochimiques (qPCR ; Western Blots). Option 2, utilisés uniquement en électrophysiologie ex-vivo. L'organisation des réseaux corticaux change en fonction du stade développemental, de l'expérience de chaque individu et de l'influence de l'environnement. De fait, les modèles rats ne peuvent à ce jour pas être remplacés (R) par des modèles in vitro ou in silico.

Afin de limiter leur stress, les rates gestantes sont dès leur réception acclimatées à leur nouvel environnement dans une cage commune de 48h à 72h. Elles sont ensuite installées dans des cages individuelles pour une période d'adaptation avant la naissance de 48h minimum. Les injections de

cannabinoïdes seront faites en sous-cutanée afin de réduire au maximum le stress et la douleur. Les manipulations par l'expérimentateur sont limitées afin de diminuer le stress. Les faibles doses de cannabinoïdes utilisées dans le projet sont anxiolytiques.

Outre ces approches de Réduction/Raffinement, notre estimation des besoins en animaux et fondée sur les données de nos investigations passées.

Etude statistique: Les tests statistiques utilisés sont non-paramétriques, adaptés aux petits échantillons (Mann-Whitney). Nous avons établi que des groupes entre 10-30 animaux (pour l'ex vivo électrophysiologie/biochimie) et 10-20 animaux (comportement) sont nécessaires pour atteindre une différence significative ($p < 0.05$) avec une puissance de 80 % dans des tests non paramétriques (Mann-Whitney). L'effet minimum observé varie selon les mesures de 15 à 70%.

Sur une période de 5 ans, nous utiliserons 50 rates allaitantes et leur progéniture (300 femelles et 300 mâles au maximum), soit 650 rats.

12350 La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions cognitives et notamment de la mémoire. Elle conduit à un état de démence qui est extrêmement destructeur pour les patients et leurs familles et qui représente un coût très élevé pour la société. Il n'existe à ce jour aucun traitement qui stoppe la progression de la maladie. Seuls 4 médicaments sont indiqués dans la maladie d'Alzheimer et ils traitent principalement les troubles de la mémoire.

Les causes de la maladie demeurent mal connues et plusieurs hypothèses sont avancées par la communauté scientifique. La recherche actuelle vise à améliorer les connaissances fondamentales sur les désordres moléculaires et cellulaires conduisant à la maladie et aux démences apparentées, sur les causes et déterminants possibles de ces maladies, et sur cibles potentielles pour une intervention thérapeutique.

Parmi les hypothèses existantes, celle de l'implication du peptide amyloïde considère que la surproduction d'un peptide amyloïde anormal et son accumulation en plaque au niveau du cerveau est décisive pour le déclenchement de la pathologie. Dans ce projet nous ne nous intéresserons uniquement à cette hypothèse.

Dans ce contexte, un des modèles animaux le plus utilisé est basé sur l'induction et le développement de dépôt de plaques amyloïdes dans le cerveau de rats. Pour cela, les rats reçoivent une administration de peptide amyloïde et leur état clinique est suivi par des tests comportementaux comme l'échappement passif, la reconnaissance d'objet et l'alternance spontanée en labyrinthe.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R,

Remplacement : aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. En effet, le développement de la maladie d'Alzheimer et son expression impliquent des interactions multiples et complexes. Bien qu'il soit possible de disséquer les événements individuels en détail avec des études in vitro, toutes les interactions impliquées dans la pathologie in vivo ne sont pas possibles à simuler in vitro. Cependant les molécules testées dans ce projet ont fait l'objet d'une sélection sur des tests in vitro afin de choisir celles qui ont le plus fort potentiel dans l'indication thérapeutique testée.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesures sont mises en œuvre notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement adaptées, une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis. Les douleurs péri-opératoires de ce projet sont prises en charge par un traitement antidouleur. La chirurgie est réalisée sous anesthésie.

Réduire : nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 10 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 1 500 rats est envisagée.

12351 Outre les troubles cognitifs sévères, la maladie d'Alzheimer se caractérise par des dégénérescences neuro-fibrillaires et des plaques amyloïdes dans le cerveau. Les plaques amyloïdes sont dues à l'agrégation d'une forme longue de protéines dites bêta amyloïdes provenant d'un clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde, l'APP (pour amyloid precursor protein). Les fonctions de l'APP restent, aujourd'hui encore, mal connues. Pour les étudier, on utilise des souris chez qui l'APP n'existe pas ; on les dit knocked out (KO) pour l'APP. Pourquoi développer un modèle similaire chez le Rat ? Contrairement à ce qui peut être fait chez la souris, les possibilités de tester les capacités d'apprentissage et de mémorisation chez le Rat sont plus diversifiées, plus faciles à mettre en œuvre. Qui plus est, au moins un test considéré comme particulièrement pertinent en matière d'évaluation des capacités d'apprentissage et de mémorisation, notamment spatiale, mais aussi suffisamment documenté dans la littérature pour en faire un incontournable, est réalisé dans un milieu aquatique ; il s'agit du test de la piscine de Morris. Si ce milieu fait partie de l'écosystème du rat, il n'en va pas de même chez la souris, chez qui il est beaucoup plus anxiogène. Enfin, pour un certain nombre d'examen neurochimiques, les approches sont d'autant plus fiables, voire faisables, que la quantité de tissu dont on dispose est généreuse. Or le cerveau du rat est plus volumineux que celui de la souris. Notre projet vise à phénotyper le comportement de rats KO pour l'APP. Nous disposerons de rats dits 'wild type' (témoins non OGM), d'hétérozygotes et d'homozygotes. Le phénotypage sera fait à 3 âges (2 mois, 12 mois et 18 mois). Le nombre total de rat est de 108 avec pour chaque âge, 12 rats hétérozygotes, 12 rats homozygotes pour le gène APP et 12 rats wild type. Soit au total 3x12 rats hétérozygotes, 3x12 rats homozygotes et 3x12 rats wild type. Après acclimatation aux conditions d'élevage au laboratoire (10 jours), nous évaluerons successivement, i) l'anxiété dans un labyrinthe en croix surélevé, ii) l'activité locomotrice en cage d'élevage sur 24h (nourriture et eau ad libitum), iii) la locomotion dans un champ ouvert, iv) la coordination sensori-motrice avec le test de la barre, v) la mémoire spatiale en piscine de Morris et vi) la coopération entre deux systèmes de mémoire, la mémoire spatiale et la mémoire procédurale dans le labyrinthe en double-H mis au point et validé au laboratoire. L'ensemble des tests est compatible avec les trois âges étudiés. L'analyse statistique des données utilisera essentiellement une ANOVA à 1 ou plusieurs facteurs et des tests post-hoc (Newman-Keuls) si pertinents. Au terme des tests, les rats seront transférés à notre partenaire pour des études biochimiques. Les conditions d'élevage et les expériences comportementales prendront en compte la règle des '3R' : le 1er 'R', 'réduire' le nombre d'animaux avec 12 rats/groupe pour une puissance statistique suffisante à l'interprétation des données et le 2e 'R', 'raffiner' soit limiter au maximum le stress et l'anxiété des animaux par : i) habituation à l'expérimentateur/manipulation, ii) habituation aux procédures et dispositifs dans les tests de comportement et iii) enrichissement des cages (bâton à ronger). A l'heure actuelle, aucune méthode alternative ne peut répondre à la question posée.

12352 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie rare d'origine génétique qui touche l'ensemble des muscles de l'organisme (muscles squelettiques, muscle cardiaque et certains muscles lisses). Elle est causée par l'absence de la protéine dystrophine dans les fibres des muscles squelettiques et dans le cœur. Cela se traduit, dans les fibres musculaires, par une fragilité de la membrane, une fuite de créatine kinase vers la circulation sanguine et une élévation de la concentration de calcium. Cela a pour conséquence de nombreux dysfonctionnements qui aboutissent à une nécrose musculaire, accompagnée d'une réponse inflammatoire chronique, un stress oxydatif, l'accumulation de tissu conjonctif (fibrose) et adipeux dans le muscle, et finalement une perte de la fonction musculaire. La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie à transmission dite récessive liée au chromosome X puisque le gène DMD est présent sur le chromosome X. Seuls les garçons ayant une anomalie sur ce gène sont atteints de la maladie. Les femmes ayant un chromosome X porteur d'une anomalie sur le gène DMD ne présentent le plus souvent aucune gêne mais ce chromosome X peut se transmettre à leur descendance. Cette myopathie touche en moyenne dans la population générale 4,78 personnes pour 100.000

personnes et 15,1 nouveau-nés sont atteints de la maladie pour 100.000 naissances. Il y aurait en France environ 3500 personnes atteintes de la dystrophie musculaire de Duchenne et chaque année environ 100 à 150 garçons nouveau-nés en sont atteints.

Cliniquement, cela se traduit chez les garçons atteints de DMD par une paralysie qui débute vers 3 ans. Cette paralysie progresse ensuite rapidement : les patients deviennent dépendants d'un fauteuil vers 10-12 ans, puis la maladie touche sévèrement les muscles respiratoires et le cœur. Lorsque la prise en charge médicale est optimale, les patients meurent généralement avant 30 ans des suites de la cardiomyopathie, de détresse respiratoire, ou d'une infection secondaire à la gastrotomie (pour permettre l'alimentation de patients qui ne peuvent plus mâcher ni déglutir) ou la trachéotomie (pour assurer la ventilation mécanique permanente).

Aucun traitement efficace n'est disponible à ce jour. Seuls les stéroïdes permettent de ralentir le cours de la maladie pendant 2-3 ans. Cependant leur utilisation est associée à de nombreux effets secondaires, dont certains sont sévères (prise de poids, sauts d'humeur, fragilité osseuse augmentant le risque fractures suivi du cercle vicieux immobilisation-fonte musculaire).

Afin de reproduire la dystrophie musculaire de Duchenne, plusieurs modèles murins ont été créés artificiellement par mutagenèse chimique à l'aide du N-éthyl-N-nitrosourée (ENU). Ces différents modèles murins permettent d'augmenter la compréhension des processus physiopathologiques de la DMD. Notamment, il existe des souris mdx5Cv qui présentent une mutation sur l'exon 10 du gène codant pour la dystrophine. Ce modèle mdx5Cv est considéré comme un modèle de choix pour étudier la DMD avec un phénotype plus sévère que la plupart des autres modèles mdx. Par exemple, les souris porteuses de la mutation sur le gène mdx présentent un taux plasmatique élevé de créatine kinase. La plupart des approches thérapeutiques disponibles actuellement en clinique ont été développées à l'aide de ces modèles murins. A titre d'exemple, les polyphénols de thé vert, le tamoxifène et le riméporide font tous actuellement l'objet d'essais cliniques en tant que traitements possibles de la DMD.

L'objectif du présent projet est de maintenir en élevage des souris mdx et de produire des lots expérimentaux. Les animaux générés dans cette étude seront destinés à une équipe de recherche travaillant sur le développement de traitements de la dystrophie musculaire de Duchenne. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique des cages et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances quotidiennes nous permettront d'identifier d'éventuelles souris en souffrance et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves).

Pour pouvoir répondre aux besoins du client et livrer les lots requis pour ses études, nous estimons qu'un total de 1250 souris sera utilisé dans ce projet d'une durée de 3 ans.

12353 Il y a environ 20 000 ans, des poissons téléostéens de rivière sont tombés accidentellement dans des grottes. Ils ont au cours de l'évolution perdu leurs yeux et leur pigmentation et sont devenus des poissons cavernicoles. Leurs congénères de surface n'ont pas disparu au cours de l'évolution et vivent toujours dans les rivières de surface. Ces deux populations de poissons, surface et cavernicole, appartiennent toujours à la même espèce. L'adaptation à la vie souterraine, en absence permanente de lumière est accompagnée de changements dans le comportement des poissons cavernicoles (comparé aux poissons de surface) : la hiérarchie entre individus a disparue, ils ne nagent pas en banc, ils dorment moins, ils sont beaucoup moins agressifs que les poissons de surface, ils recherchent constamment de la nourriture, ils sont attirés par des vibrations à la surface de l'eau, ils explorent en permanence leur environnement et leurs capacités chimio-sensorielles sont augmentées. C'est ce que l'on appelle le « syndrome comportemental » du poisson cavernicole.

Au cours de l'évolution ces comportements ont pu apparaître sous l'effet de mutations génétiques, de modifications du développement, de la plasticité neuronale. Très certainement c'est une combinaison de ces différentes composantes biologiques qui a permis à des poissons ancestraux de surface de s'adapter à la vie cavernicole.

Ce projet vise à comprendre comment certaines des composantes participent à la modification du système nerveux central et des comportements qu'il gouverne dans le cadre de l'adaptation à des changements d'environnement.

Nous utiliserons dans cette étude une approche comparée de l'étude du comportement entre différents lots de poissons. Nous comparerons la population de poisson de surface avec la population de poissons cavernicoles aveugles pour l'aspect mutations génétiques.

Nous allons comparer les comportements de locomotion, d'agressivité, de nage en banc, de production de sons et d'olfaction. Nous utiliserons au total 5100 poissons.

Grâce aux résultats que nous espérons obtenir nous pourrions mieux comprendre les mécanismes évolutifs et biologiques qui seul ou combinés permettent à des animaux de survivre à un changement brutal d'environnement (lumière, température, nourriture) puis comment au cours de l'évolution ces mêmes animaux deviennent adaptés à ce nouvel environnement.

Nous prendrons soin de respecter la règle des 3R grâce aux mesures suivantes :

Remplacement : Les comportements étudiés dans ce projet sur des poissons adaptés à des milieux différents sont non prévisibles, notre projet nécessite donc une approche in vivo. Raffinement : nous avons mis en place des conditions d'observation du comportement qui visent à minimiser au maximum le stress des animaux : ni contention humaine, ni immobilisation, ni contrainte dans un espace réduit. Réduction : afin de réduire les nombres nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques qui permettent d'obtenir des résultats fiables avec moins d'animaux. Les tests d'observation comportementaux étant non invasifs nous utiliserons les mêmes animaux dans différents tests de comportement ce qui contribuera aussi à réduire le nombre d'animaux utilisés. Nous ne nous attendons pas à observer de signe de souffrance autre que parfois un stress lié au changement d'aquarium. Cependant, nous suivrons les signes de souffrance éventuels des animaux et procéderons si nécessaire à une interruption de l'expérience.

12354 Ce projet consiste à évaluer chez la souris des candidats vaccins élaborés dans notre laboratoire. Ces vaccins, destinés à l'homme ou l'animal, sont constitués de levures productrices d'antigènes issus de pathogènes cibles. Cette stratégie vaccinale est peu coûteuse et avantageuse pour la production de vaccins à grande échelle et à faible coût. Grâce à ces caractéristiques, elle vise à cibler les maladies infectieuses émergentes et/ou endémiques dans les pays en voie de développement ainsi que les maladies vétérinaires. De plus, cette stratégie vaccinale est conçue pour être utilisée en toute absence de produits exogènes (adjuvants), composants essentiels de la majorité des vaccins disponibles sur le marché, dont le coût est non-négligeable et dont l'éventuel impact négatif sur la santé est en permanence rediscuté.

Nous avons déjà évalué cette stratégie vaccinale dans le contexte du paludisme - une maladie infectieuse majeure touchant plus de 200 millions de personnes par an, et qui dans plus de 600 000 cas entraîne le décès du patient, en majorité des enfants de moins de 5 ans. Les premiers essais de ce nouveau vaccin chez la souris nous ont permis de montrer que celui-ci induit une amélioration significative du cadre clinique associé à l'infection, et engendre une diminution importante du nombre de parasites dans le sang suite à l'infection.

Suite à ces résultats encourageants, nous envisageons d'adapter cette plateforme à d'autres maladies infectieuses, afin de démontrer plus largement l'efficacité de celle-ci. Nous allons l'appliquer à plusieurs maladies infectieuses, qui induisent les pathologies graves chez l'homme ainsi que chez les animaux de rente. L'évaluation de chaque vaccin candidat chez la souris nous est essentielle afin de pouvoir sélectionner les formulations les plus performantes, qui vont ensuite être testées chez l'homme ou chez l'animal. Dans un premier temps, nous visons à adapter cette stratégie vaccinale pour générer un vaccin candidat contre l'entérovirus 71, l'agent responsable de la maladie pieds-mains-bouche et du syndrome neurologique proche de la poliomyélite, notamment chez les enfants. Nous allons, en parallèle, utiliser cette stratégie vaccinale pour lutter contre un des virus responsables des maladies graves chez les porcins dans l'Asie du Sud-Est. L'utilisation de cette stratégie vaccinale à d'autres maladies infectieuses est en cours de discussion.

Ce programme est très important pour notre Unité car il produit les premières preuves de concept de l'efficacité des candidats vaccins qui déterminent les phases ultérieures du développement, susceptibles de produire des nouveaux vaccins humains et vétérinaires. En accord avec nos activités précédentes et nos projets futurs, l'ensemble du programme implique l'utilisation de 952 animaux sur une durée de 5 ans. Nous utiliserons un nombre minimal nécessaire des animaux et ce dans les expériences où on ne peut pas remplacer le modèle animal par les tests in vitro. Ces expériences seront faites en accord avec la réglementation nationale et Européenne afin de minimiser la souffrance des animaux.

La stratégie vaccinale à l'essence de ces candidats vaccins a été développée dans le laboratoire et fait l'objet de deux demandes de brevets. Le but ultime de cette activité est la mise à disposition de vaccins préventifs contre plusieurs pathologies infectieuses graves pour lesquelles il n'existe pas de vaccin.

12355 Les maladies douloureuses chroniques touchent près de 30% de la population. Elles sont dues à une inflammation périphérique (douleur inflammatoire) ou à une lésion nerveuse (douleur neuropathique). A l'inverse de la douleur aiguë qui a un rôle protecteur pour l'individu, puisqu'elle l'alarme de l'application de stimuli nocifs, la douleur chronique est délétère pour l'individu car elle affecte négativement la qualité de vie des patients et leur vie sociale, d'autant qu'elle s'accompagne, avec le temps, de comportements anxio-dépressifs. Malheureusement, l'efficacité des traitements actuels (qu'ils soient médicamenteux ou par stimulation cérébrale) reste insatisfaisante. Ceci est lié à une mauvaise compréhension des mécanismes sous-jacents à la chronicisation de la douleur. Des approches multidisciplinaires nouvelles sont nécessaires pour pallier à ce problème, en utilisant de nouveaux modèles animaux transposables à la recherche chez le patient. Ce projet de recherche vise, grâce à l'utilisation d'une nouvelle technique de neuro-imagerie (imagerie ultrasonore hyper-rapide, hypersensible), d'imager dans le cerveau de rongeurs 1) les zones cérébrales activées au cours de l'application d'une stimulation douloureuse. 2) Nous souhaitons étudier aussi les altérations de fonctionnement des réseaux cérébraux liées à la douleur persistante. 3) Une fois ces altérations décrites, nous souhaitons identifier les mécanismes moléculaires qui les sous-tendent de façon à les bloquer, en espérant bloquer la persistance de la douleur. Le but ultime de cette recherche est de mieux comprendre les changements observés chez l'homme et de mieux les traiter.

Le recours à l'utilisation d'animaux de laboratoire est nécessaire car ce projet nécessite une approche intégrée, de la molécule à l'imagerie, en passant par le comportement. Ce projet de recherche nécessite l'utilisation de modèles animaux de douleur persistante. Nous avons choisi les modèles les plus courts et les moins douloureux possibles. Un grand soin sera porté afin d'empêcher ou minimiser au maximum tout stress ou souffrance aux animaux, comme un suivi clinique journalier utilisant l'échelle validée par le comité d'éthique, les conditions d'élevage et enfin le modèle animal qui a été réfléchi afin de garantir le bien-être animal.

Le nombre d'animaux inclus sera le plus petit possible, tout en veillant à ce qu'il permette de réaliser une analyse statistique des résultats. Lorsque ce sera possible, des modèles utilisant des animaux anesthésiés seront préférés de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux douloureux. Ces travaux nécessiteront au maximum 140 rats et 150 souris (en y incluant les animaux contrôles ne recevant pas de stimulations douloureuses), pour une durée de 5 ans.

12356 Le cortex cérébral est un tissu dont la surface est extrêmement plissée, formant des circonvolutions appelées parfois 'sillons' dont la forme et les motifs sont une signature unique de l'individu, au même titre que les empreintes digitales. Par ailleurs il a aussi été montré que ces plis et leurs motifs peuvent être perturbés par la maladie et donc peuvent en être des marqueurs. Cependant, la très grande variabilité de motifs entre les individus rend la tâche difficile par exemple pour distinguer un motif 'sain' d'un motif pathologique. Le mécanisme de formation de ces plis lors du développement doit donc être étudié pour comprendre cette variabilité apparente. Chez les primates dont le cortex est plissé (singes de l'ancien monde, grands singes, humains), le plissement du cortex se fait entre la moitié et la fin de la gestation, avec des changements importants d'une semaine à l'autre. A la

naissance, la presque totalité des motifs de plissement observables à l'âge adulte le sont déjà. Il est donc impératif, afin de le comprendre, d'observer et de quantifier l'évolution du plissement cortical pendant la deuxième moitié de la gestation, à un rythme d'au moins une fois par semaine. L'outil privilégié pour une telle observation est l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Il n'est pas possible pour des raisons légales d'effectuer une telle étude sur des femmes enceintes sans pathologie. Cependant, grâce à leur proximité phylogénétique avec les humains, les primates non-humains (PNH) peuvent nous permettre de comprendre ce mécanisme commun de plissement cortical prénatal.

L'objectif de ce projet est donc d'effectuer une étude sur une femelle babouin (*Papio Anubis*) gestante (et par conséquent sur son fœtus) afin de démontrer la faisabilité d'une observation longitudinale par IRM du développement cérébral à la fréquence d'une acquisition par semaine, ce qui constituera une observation unique à ce jour. Dans une optique de raffinement, le stress induit pour la femelle gestante sera réduit autant que possible (capture sans contention, transport dans le noir pour réduire le stress), la viabilité fœtale sera vérifiée par échographie à chaque acquisition, l'anesthésie sera optimisée pour supprimer toute neurotoxicité, et des tests comportementaux seront effectués 6 mois après la naissance pour valider l'absence d'effets indésirables sur le fœtus en développement. Aucune méthode alternative n'existe à ce jour pour répondre à la question posée.

12357 Le développement et le fonctionnement du système nerveux dépendent du maintien de l'intégrité du génome. D'une part, de nombreux troubles neurologiques humains d'origine génétique résultent d'une signalisation et d'une réparation défectueuse de l'ADN (syndrome de Cockayne, ataxie télangiectasie...). D'autre part, le cerveau humain peut être exposé à de nombreux agents endommageant l'ADN, tels que les polluants, et à des rayonnements ionisants (utilisations médicales pour le diagnostic ou les traitements de tumeurs, accidents nucléaires). Il est établi que les rayonnements ionisants à des doses supérieures à 100-200 mGy peuvent induire de nombreuses pathologies cérébrales quand l'irradiation a lieu pendant la formation du système nerveux central, telles que la microcéphalie et des troubles intellectuels ou cognitifs.

Notre projet s'intéresse à la caractérisation à l'âge adulte des conséquences délétères à long terme d'irradiations ionisantes modérées (100 - 1000 mGy) in utero ou après la naissance, phases les plus radiosensibles du développement cérébral. Nous utilisons pour cela l'imagerie par résonance magnétique (IRM) chez des souris normales ou déficientes pour le système NHEJ de réparation de l'ADN. Afin de mieux appréhender les mécanismes biologiques sous-jacents aux effets neurologiques radio-induits, des tests comportementaux et des analyses immunohistologiques compléteront notre étude. Les données IRM seront acquises à l'aide d'un scanner IRM à 11,7 Tesla. En raison de l'aspect dynamique des réponses des niches neurogéniques (neurotransmetteurs, facteurs de croissance, hormones...) à leur environnement biochimique immédiat, il est nécessaire d'évaluer ces effets sur un organisme intégré. Notre étude, conçue avec la volonté de respecter les règles éthiques, vise à réduire le nombre d'animaux (maximum 339 rongeurs nés et élevés en captivité, issus d'un établissement autorisé) en utilisant l'IRM, une technique d'imagerie non-invasive garantissant des données de qualité en un temps raisonnable. Après une étude pilote qui permettra d'affiner notre protocole, la caractérisation de ces différents modèles d'irradiation et de leurs conséquences neuropathologiques nous permettra de valider nos biomarqueurs IRM des lésions cérébrales radio-induites. Elle ouvrira la voie à une prise en charge non-invasive de patients exposés de manière accidentelle ou dans un cadre thérapeutique à de faibles doses de radiations.

Le projet dans sa globalité est classé au degré de sévérité légère. En effet, l'irradiation est réalisée chez l'animal vigile sans contraintes et toute autre intervention sur les animaux est réalisée sous anesthésie, à l'aide de méthodes peu invasives. Les protocoles d'anesthésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Une visite quotidienne des animaux sera effectuée pour s'assurer du bien-être des animaux avec la mise en place et l'application de critères d'arrêts tout au long de l'étude. Dans le cas d'effet inattendu, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou de décider de l'euthanasie. Le projet a été soumis au comité d'éthique et l'ensemble de ses recommandations seront mises en œuvre.

12358 La reproduction chez la chèvre est dite saisonnée, elle alterne des périodes de repos sexuel et d'activité sexuelle selon la saison. Le principal facteur environnemental ayant un effet sur la saisonnalité de la reproduction des caprins réside dans les variations annuelles de la durée du jour. Ce contrôle photopériodique est régulé par la mélatonine qui est sécrétée par la glande pinéale pendant les périodes d'obscurité. La mélatonine interagit ensuite avec les hormones du cycle sexuel. Ainsi à l'automne, lorsque les nuits sont longues, la mélatonine est sécrétée plus longtemps et déclenche la cyclicité des chèvres.

Pour répondre à la demande annuelle et aux fluctuations du prix du lait, la période d'activité sexuelle peut être modifiée en manipulant la durée d'éclairage à laquelle sont soumises les chèvres. Une alternance artificielle de jours longs et de jours courts permet de stimuler leur activité sexuelle à différentes périodes de l'année et donc de produire en toutes saisons. Cette manipulation de la durée du jour est appelée traitement photopériodique, c'est une méthode de désaisonnement très répandue en élevage caprin. Cette technique est également utilisée sur les boucs en centre d'insémination pour produire de la semence à l'année.

Les recommandations actuelles pour le traitement lumineux de désaisonnement caprin se limitent à préconiser un minimum de 200lux à hauteur des yeux des chèvres. Mais, sur la base de recherches sur d'autres espèces animales, ce n'est pas l'intensité seule mais une gamme de longueurs d'ondes spécifique qui joue sur la sécrétion de mélatonine et les rythmes circadiens. Caractériser la part utile du spectre lumineux pour les traitements photopériodiques utilisés en élevage permettrait d'améliorer les recommandations d'éclairage (gamme du spectre x intensité minimale), valider l'efficacité et donc la possibilité d'utilisation d'éclairages à LED. De plus, la mise en œuvre des traitements photopériodiques en élevage peut parfois s'avérer contraignante en raison des incompatibilités horaires entre l'éclairage nécessaire au travail de l'éleveur et éclairage lié au traitement. La définition d'un spectre adapté pourrait limiter ces interférences et favoriser la généralisation de cette pratique.

La caractérisation de la part du rayonnement lumineux utile sera réalisée en 2 étapes impliquant un total de 34 boucs. L'étape 1, impliquant 18 boucs, consistera à comparer l'effet d'une exposition à différentes zones du spectre (rouge/bleu) ou au spectre complet (blanc) et à différentes intensités lumineuses (200, 70 et 10lux) sur la sécrétion de mélatonine et le cortisol. Chaque bouc subira 91 prises de sangs (PSg) et 7 prélèvements salivaires (PSal) répartis en : 3 Psg et 3 PSal réalisées en parallèle à 1h d'intervalle de nuit lors de la prémanip, 4 sessions de 22 Psg réalisées au rythme d'une prise de sang toutes les 20minutes pendant 7h selon un traitement lumineux spécifique et 1 Psal réalisée en parallèle de la dernière Psg de chaque session, les sessions étant espacées d'au moins 2 semaines de repos. L'étape 2 consistera à comparer l'efficacité du traitement lumineux utilisé classiquement en centre de production de semence (alternance continue de 2 mois de jours longs de 16h d'éclairage et 2 mois de jours courts de 8h d'éclairage) appliqué soit avec des néons soit avec des modèles de LED apportant le minimum nécessaire (couleur/intensité) défini à l'étape 1. Celle-ci sera évaluée par une mesure hebdomadaire de la testostérone et des performances de production de semence sur 2 lots de 8 boucs, soit un total de 54 Psg par bouc sur 1 an.

Les exigences de remplacement, réduction et raffinement ont été prises en compte comme suit :

- Remplacement : il n'existe pas de méthode permettant d'éviter ou de remplacer l'utilisation de boucs pour décrire comment les hormones mélatonine et cortisol sont sécrétées pendant l'exposition à différents traitements lumineux et caractériser la part « utile » du spectre lumineux impliquée dans le contrôle de la saisonnalité de la reproduction des caprins. Un remplacement relatif (c'est-à-dire remplacer les boucs par des animaux ayant un moindre potentiel de perception de la douleur, comme certains invertébrés) n'est pas envisageable dans la mesure où la sensibilité aux traitements lumineux, la sécrétion de mélatonine associée et leurs variations sont propres à chaque espèce.

- Réduction : Un calcul du nombre de sujets nécessaires a été réalisé afin d'estimer au plus juste le nombre d'animaux à inclure dans le projet. Le nombre et la fréquence des prises de sang pour le suivi hormonal a été réduit au minimum nécessaire et suffisant à l'établissement de profils interprétables. Les prises de sang pour dosage de la mélatonine et du cortisol ont été regroupées afin de limiter le nombre de prélèvements par animal (2 dosages à partir d'une seule introduction

d'aiguille pour la prise de sang). Il est recommandé de ne pas prélever plus de 10% du volume sanguin total en 1 fois. Le volume de sang prélevé en 1 journée est de 110mL, ce qui est 5,7 fois inférieur au seuil recommandé estimé pour un bouc de 90kg.

- Raffinement : Afin de limiter la durée du prélèvement et le stress éventuel, la contention, les PSg et PSal seront réalisés par des binômes de préleveurs expérimentés. Chez les caprins, les prélèvements sanguins sont réalisables facilement à la veine jugulaire sans nécessité d'anesthésie, car la contention est aisée et que l'animal se laisse faire. Pour les prélèvements sériés, il n'est pas envisageable de poser des cathéters car les boucs risquent de détériorer le matériel et compromettre les prélèvements. Une attention particulière sera donc portée aux veines jugulaires des animaux lors des prélèvements sériés pour repérer tout signe de phlébite ; un baume antiseptique et cicatrisant sera appliqué massage sur les veines à la fin de chaque session. L'objectif des PSal est d'évaluer la faisabilité de dosages mélatonine et cortisol sur la salive de façon à pouvoir s'affranchir des prises de sang pour de prochains projets.

12359 Le développement de certains composés pharmaceutiques ou chimiques requiert des explorations in vivo chez le rongeur, à part des études réglementaires à proprement parler. Ces études peuvent être demandées ou non par les autorités réglementaires, pour affiner ou mettre en place des conditions expérimentales, ou pour répondre à des questions de sécurité, ou pour explorer les mécanismes d'action. Ces études peuvent donc servir à affiner les expériences en amont des études réglementaires qui devront être réalisées par la suite, en permettant de limiter le nombre global d'animaux utilisés dans le développement d'un produit. Elles peuvent aussi directement contribuer à assurer la sécurité non-clinique des médicaments en comprenant mieux leurs mécanismes.

Ce projet se résume en l'administration d'un produit pharmaceutique ou chimique chez le rongeur. La fréquence et la durée d'administration sont variables en fonction des composés à tester, de l'objectif de l'étude, et de l'application chez l'homme. La voie d'administration est celle utilisée chez l'homme pour les produits pharmaceutiques (orale, dans la nourriture, application dermale, intraveineuse, intra articulaire, etc.) ou la voie d'exposition potentielle de l'homme pour les produits chimiques (orale, dermale...). Il n'existe pas de méthode alternative in vitro pour ce type de procédure de traitement identique à celle utilisée chez l'homme, en raison notamment de la complexité que représente un organisme vivant.

L'animal choisi est le rongeur, car c'est l'espèce acceptée pour ce type d'étude et pour laquelle un grand nombre de données est disponible.

Le nombre d'animaux utilisé dans le cadre de ce projet est très variable selon le protocole expérimental. Il est déterminé à minima afin d'obtenir des résultats représentatifs et exploitables statistiquement et ainsi d'atteindre tous les objectifs spécifiques de l'étude en procédant à toutes les analyses nécessaires sur un nombre d'animaux optimisé. Il est attendu d'utiliser 5800 rongeurs sur la durée du projet. Si nécessaire, l'administration du composé à tester est réalisée sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur (voie intra articulaire par exemple), et l'on peut recourir à l'usage d'analgésiques pour diminuer la douleur si elle n'a pas pu être évitée. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée. Les animaux sont hébergés dans la mesure du possible en groupe dans des cages conformes à la Directive 2010/63 avec enrichissement

12360 Le développement récent de la technique de Shadow Imaging (SUSHI), basée sur la microscopie de super-résolution, offre de nouvelles perspectives pour étudier in vivo le cerveau avec une résolution inédite. La caractérisation des structures synaptiques et de l'espace extracellulaire (ECS) dans les conditions les plus physiologiques est essentielle pour mieux comprendre le fonctionnement de notre cerveau. En effet, la mémorisation et l'apprentissage sont des phénomènes impliquant des remaniements des connexions entre les neurones. Ces connexions

appelées synapses sont extrêmement plastiques. Lors d'un apprentissage, leur nombre et leur forme sont modifiés. Cette plasticité synaptique est cruciale car elle permet de réguler la transmission entre les neurones. Ainsi, étudier la forme et l'évolution de ces synapses, en particulier les épines dendritiques, au cours du temps est essentiel pour comprendre les mécanismes impliqués dans la mémorisation et l'apprentissage. De même, l'espace extracellulaire qui représente environ 25% du volume cérébral sert de microenvironnement pour le cerveau et forme un canal de communication chimique intercellulaire (appelé transmission de volume). Cette transmission en volume peut être modulée par les propriétés biophysiques de l'ECS, en particulier les paramètres de diffusion. Il a été montré que la structure et la diffusion de l'ECS sont très hétérogènes et qu'elles dépendent de conditions internes et externes, telles qu'un œdème cellulaire provoqué par un traumatisme cérébral. De plus, l'ECS fournit un réservoir pour les ions impliqués dans l'activité électrique des neurones et joue un rôle clé dans la transmission de substances neuroactives entre les cellules. Ainsi, l'ECS n'est pas seulement le siège de toutes sortes d'interactions cellule-cellule, mais peut également jouer un rôle important dans des fonctions neuronales cruciales, telles que la mémorisation ou la formation de circuits neuronaux.

En utilisant la technique de SUSHI combinée à la microscopie STED à 2-photons, notre projet vise à caractériser *in vivo* la dynamique et la structure des épines dendritiques et de l'ECS (1) dans les conditions basales, (2) suite à un apprentissage, (3) suite à un traumatisme crânien et (4) suite à un accident vasculaire cérébral au cours du temps (plusieurs heures ou jours) à l'échelle nanométrique. Ces sous-projets feront l'objet d'autres demandes d'autorisation puisqu'ils requièrent en amont des procédures chirurgicales ou de comportement qui seront effectués dans d'autres établissements (Cf Annexe Apafis 18628). Dans ce projet, 191 souris WT et 306 souris transgéniques seront utilisées. La qualité de la mise en œuvre des procédures (expertise reconnue de l'expérimentateur) garantira le respect du bien-être animal et permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés. L'anesthésie pour les séances d'imagerie seront faites avec les molécules les plus adaptées. Le confort de l'animal sera pris en compte avec le plus grand soin. De plus, l'utilisation de l'imagerie photonique chronique permet de réduire le nombre d'animaux au moins par deux, puisque chaque souris constitue son propre contrôle. À noter que ce lien entre les modifications morphologiques et l'altération des fonctions des synapses et de l'ECS, ne peut être réalisée de manière pertinente avec des modèles *in silico* ou *in vitro*.

12361 Le cancer de la prostate représente la tumeur maligne primitive la plus fréquente et la troisième cause de décès par cancer chez les hommes dans les pays développés. Plusieurs types de traitements peuvent être proposés selon le résultat des différents examens réalisés lors du bilan diagnostique : chirurgie, radiothérapie externe, curiethérapie, hormonothérapie et surveillance active. Pour les tumeurs métastatiques, la prise en charge est basée sur la privation androgénique, mais une résistance à la castration devient inéluctable après un délai moyen de dix-huit mois, nécessitant classiquement l'introduction d'une chimiothérapie systémique par docétaxel. Cependant, malgré ces avancées thérapeutiques, le cancer de la prostate représente encore environ 15% des décès toutes causes confondues chez les hommes.

Ces données justifient le besoin urgent d'augmenter le répertoire actuel de l'option thérapeutique, notamment dans les cas de cancers de la prostate métastatique résistants à l'hormonothérapie. Dans ce contexte, notre plateforme propose à ses partenaires de réaliser des tests précliniques chez la souris afin d'évaluer l'efficacité de leurs composés thérapeutiques innovants les plus prometteurs. Pour cela, les modèles que nous utilisons sont basés sur la transplantation de cellules tumorales humaines à des souris immunodéficientes à même de « mimer » la maladie observée en clinique et de prédire la réponse thérapeutique. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode satisfaisante qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale durant cette étape préclinique.

Nous utiliserons la méthode des 3 R pour réduire à son minimum le nombre d'animaux et, chaque fois que cela sera possible, le modèle *in vivo* sera remplacé par des modèles *in vitro*. Nos études seront réalisées de manière séquentielle pour déterminer l'action des drogues sur le développement tumoral. Si nécessaire, des études pilotes seront menées sur un petit nombre d'animaux (maximum 15) afin de s'assurer de leur bonne tolérance à ces molécules et d'adapter les doses à administrer

à notre souche de souris. Pour chacun des composés, nous nous limiterons au nombre minimum d'animaux permettant de caractériser leur efficacité in vivo. Pour mener ces tests d'efficacité, au maximum 4 groupes de 8 animaux seront utilisés, incluant un groupe contrôle qui recevra le véhicule de solubilisation du composé et un groupe contrôle positif recevant le docetaxel. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux et lorsque possible, ces groupes contrôles seront communs à plusieurs tests d'efficacité. De même, le suivi du développement tumoral se fera par des mesures cinétiques utilisant des procédés non invasifs : la mesure du volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse et l'imagerie par bioluminescence. Les procédures de transplantation et d'imagerie seront réalisées sous anesthésie gazeuse. Enfin, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton) et par leur maintien en groupes de 4 à 5 afin d'éviter le stress de l'isolement.

Pour ce projet, qui s'inscrit dans la recherche de nouvelles formes thérapeutiques dans le traitement du cancer de la prostate, nous avons estimé pouvoir gérer au maximum 2 études de ce type par an pendant 5 ans, le nombre maximal d'animaux utilisé au cours de cette période sera donc de 790 souris.

12362 L'insuffisance cardiaque, respiratoire ou rénale terminales sont des problèmes majeurs de santé publique. La transplantation d'organe est le meilleur traitement car elle permet d'améliorer la qualité et la durée de vie des patients. Cependant, la morbidité et la mortalité des patients transplantés restent élevées. Ceci s'explique principalement par une forme particulière de rejet, le "rejet humoral". Ce dernier est causé par les lymphocytes B et le développement d'anticorps contre l'organe greffé et n'a pas de traitement actuellement.

L'objectif de ce projet est de tester une nouvelle approche de thérapie cellulaire pour prévenir le rejet humoral. Dans cette approche, les cellules T régulatrices (Tregs) des patients sont utilisées. Les Tregs sont utilisées car ces cellules ont la capacité d'inhiber la réponse immunitaire des lymphocytes B. Les Tregs sont isolées à partir d'une prise de sang puis une manipulation génétique (introduction d'un gène) est effectuée in vitro pour augmenter leur capacité à inhiber les lymphocytes B. Les Tregs thérapeutiques sont ensuite expansées puis réinjectées en grand nombre avant la greffe dans le but d'empêcher un rejet humoral.

Un modèle murin de greffe de peau sera utilisé pour tester cette nouvelle approche. Les Tregs thérapeutiques seront générées à partir de la rate et des ganglions de souris rapportrices ("Tregs-rapportrices" ou FOXP3-GFP). Après manipulation génétique et expansion in vitro, les Tregs seront injectées par voie intraveineuse à des souris receveuses (C57Bl/6J ou C57Bl/6J-gfp). Ces dernières recevront le même jour une greffe de peau à partir d'un donneur génétiquement différent (BALB/cJ ou HLAA2-C57Bl/6J). La survenue d'un rejet humoral sera évaluée par inspection de la greffe et mesure hebdomadaire du titre d'anticorps anti-donneur dans le sang.

Cette étude pourrait contribuer au développement de nouvelles approches thérapeutiques permettant de prévenir le rejet humoral et de diminuer la morbidité et la mortalité des patients transplantés. Le phénotype des souris utilisées n'est pas dommageable. Les dommages attendus sont essentiellement une mauvaise cicatrisation, des infections liées à la procédure de greffe de peau et une mauvaise tolérance du bandage mis en place. Les procédures expérimentales sont classées en "classe modérée".

La règle des 3R a été respectée lors de l'élaboration de ce projet:

- Remplacement: un modèle murin a été choisi car le processus immunologique complexe du rejet ne peut pas être reproduit autrement que dans ce type de modèle animal.

- Raffinement: des mesures spécifiques seront mis en place pour limiter les dommages possibles et limiter la souffrance, la douleur et l'anxiété des animaux après les procédures: asepsie, anesthésie, hydratation, antalgie par voie générale, ablation précoce des bandages. Une définition précise des points limites a été établie et une surveillance adaptée des animaux avec grille de score (surveillance quotidienne du poids, des bandages, de l'aspect de la greffe, de l'attitude, du comportement) sera réalisée.

- Réduction: Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans compromettre l'interprétation statistique des résultats.

1008 animaux au maximum pourront être concernés par les procédures de ce projet de 5 ans:

* Receveurs de greffe de peau: C57Bl/6J, n=648 ; C57Bl/6J-gfp, n=216.

* Donneurs de greffe de peau: C57Bl/6J-HLAA2, n=72 ; BALB/cJ, n=72.

12363 La plasticité corticale, c'est à dire la capacité du cerveau à se remodeler en fonction de l'apprentissage, serait assurée par le renforcement durable des connexions (synapses) entre neurones, appelé potentialisation à long-terme (LTP). Malgré son rôle critique dans le fonctionnement du cerveau (apprentissage, mémorisation) et de ses altérations, les mécanismes de la LTP in vivo restent largement inconnus, en raison de fortes limitations technologiques. Pour répondre à cette question essentielle, nous proposons : 1) De disséquer les mécanismes moléculaires de la LTP évoquée par la stimulation des moustaches dans le cortex somatosensoriel de rongeurs vivants ; 2) De définir la relation entre la LTP et la plasticité corticale après un changement des entrées sensorielles chez l'animal vivant. Ce projet nous permettra donc de mettre à jour pour la 1ère fois les mécanismes cellulaires de l'apprentissage et de la mémorisation, et donc de comprendre leurs altérations qui interviennent chez l'Homme au cours de pathologies psychiatriques, qu'elles soient génétiques ou liées à l'âge.

Par définition, ces études ne peuvent être réalisées qu'in vivo, et leurs résultats pourront donc être directement transférés à l'Homme. Les expérimentations décrites dans ce projet seront conduites sur des animaux vivants anesthésiés dans le plus strict respect des règles et lois éthiques en vigueur. 520 souris de génotype sauvage seront utilisées. Pour le respect de la règle des 3R, la solidité de nos hypothèses de travail (vérifiée par des expériences pilotes), la nature innovante des méthodes utilisées (microscopie biphotonique), ainsi que la qualité de la mise en œuvre des procédures (basée sur une expertise reconnue de l'expérimentateur) permettra de réduire significativement le nombre des animaux. Les chirurgies se feront sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès le réveil de l'animal et qui sera maintenue tant que l'animal montre des signes de souffrance. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

12364 La chlordécone est un insecticide qui a été utilisé dans les bananeraies des Antilles françaises, il est interdit depuis plus de 20 ans mais est encore présent dans les sols. Cette molécule est un polluant organique persistant qui peut être transféré dans la chaîne alimentaire. La question qui se pose est celle du maintien de l'élevage dans les zones contaminées. En effet, les animaux peuvent ingérer involontairement des quantités non négligeables de sol, et par ce biais les contaminants peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire et in fine contaminer l'homme via son alimentation. Afin de préserver la santé des consommateurs et de sécuriser les denrées alimentaires, l'Union Européenne a fixé des valeurs limites de résidus dans les aliments (Règlements CE N° 839/2008, Règlement UE N°1259/2011). Les plans de surveillance mis en place ont permis d'identifier des carcasses de ruminants dont les teneurs en polluants dépassaient les LMR les rendant impropres à la consommation.

La chlordécone est connue pour être métabolisée en chlordécol chez certaines espèces. Une étude récente (2018) a mis en évidence la présence de ce métabolite chez le porc. L'apparition de métabolites de la molécule mère et leur excrétion constituent des voies d'élimination de la chlordécone. Comprendre les mécanismes d'élimination du chlordécol permet de mieux comprendre le devenir de la chlordécone chez le porc et de compléter les données sériques et fécales de toxicocinétique de la chlordécone existantes chez le porc. Quatre porcs mâles castrés en croissance seront utilisés pour l'étude envisagée. Ainsi, du chlordécol sera administré par voie intraveineuse via un cathéter jugulaire. Des prélèvements de sang et de fèces seront ensuite effectués dans les 3 jours suivant l'injection sur la seconde jugulaire cathétérisée. L'euthanasie via

l'utilisation d'une tige perforante (matador) suivie d'une exsanguination immédiate sera effectuée sur les 4 porcs à 72h afin de permettre des prélèvements de bile et de contenus digestifs.

Remplacement : pour obtenir ces informations, aucun remplacement n'est envisageable pour ce type d'étude. Les données collectées serviront à la construction d'un modèle compartimental de transfert de la chlordécone à l'échelle de l'animal et permettront de calculer finement les sorties de chlordécone de l'animal.

Réduction : Le nombre d'animaux sera limité au maximum pour des raisons d'éthique. Un nombre de répétitions de 4 apparaît cependant nécessaire et suffisant pour s'assurer de la puissance statistique nécessaire (sur la base de l'expérience antérieure de l'équipe de recherche en terme d'écart-type résiduels prévisibles pour les porcs et la sensibilité analytique du dosage de la chlordécone et de son métabolite).

Raffinement : Les animaux seront placés en logement collectif conformément à la réglementation, sauf à partir de la mise en place des cathéters jugulaires pour éviter les risques d'arrachage de cathéters soit sur une période de dix jours. Cependant afin d'assurer un maximum de bien-être aux animaux, les contacts visuel, auditif et olfactif seront préservés. Des éléments d'enrichissement du milieu seront ajoutés dans les boxes.

Points limites : Compte-tenu des interventions envisagées une surveillance régulière sera nécessaire. Lors de celles-ci, des comportements d'inconfort (prostration, refus de nourriture, vocalisation) seront relevés. Par ailleurs, une évaluation de la douleur sera réalisée quotidiennement sur le comportement de l'animal. On considèrera que toute chute de poids de plus de 15% entre deux pesées (une pesée ayant lieu une à deux fois par semaine) impliquera un protocole de soin ou d'euthanasie en cas d'abatement profond. Afin de limiter toute angoisse liée à la claustration en cage individuelle, les contacts visuels, auditifs et olfactifs entre les individus seront conservés.

12365 Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont des cancers du sang caractérisés par une hyperproduction par la moelle osseuse d'un ou plusieurs types de cellules du sang (plaquettes, globules rouges, globules blancs). Cet excès de production est lié à la présence d'anomalies génétiques acquises, dont la mutation de la protéine JAK2, dans les cellules progénitrices à l'origine des cellules sanguines. Les accidents thrombotiques c'est-à-dire l'obstruction d'un ou plusieurs vaisseaux sanguins (artères ou veines) sont une cause majeure de mortalité chez les patients atteints de SMP. La thrombose veineuse cérébrale (TVC) fait partie des thromboses de localisation atypique rapportée chez 1 à 14% des patients selon les études. Parmi les autres étiologies de la TVC, on retrouve les cancers solides, la prise de contraceptif oral, la grossesse. Un échec du traitement anticoagulant (permettant la dissolution du caillot) est rapporté dans 20% des cas. Cet échec correspond à une récurrence de la thrombose ou à une transformation hémorragique.

Nous émettons l'hypothèse que le mécanisme physiopathologique des TVC liées aux SMP est différent de celui observé dans les TVC liés à d'autres causes. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués permettra de mieux guider le traitement des patients.

Afin de pouvoir étudier ces mécanismes, il est nécessaire de disposer de modèles animaux pertinents mimant au plus près la pathologie humaine. Nous réaliserons donc une thrombose veineuse cérébrale (méthode chirurgicale) chez des souris mutée pour la protéine JAK2 et des souris non mutées. Nous souhaitons comparer (1) la taille de la thrombose et son évolution sur des critères d'imagerie non invasive et sur analyse des tissus, (2) son impact clinique (séquelles neurologiques) à la phase aiguë de la thrombose puis 5 jours après. En complément, nous mesurerons des paramètres biologiques à la recherche d'une activation des plaquettes, des globules rouges et des globules blancs pouvant favoriser la formation de la thrombose ou son aggravation.

Le modèle de souris mutée pour la protéine JAK2 a déjà été développé au sein de notre unité. Il permet d'obtenir des souris développant spontanément une hyperproduction de globules rouges pouvant entraîner des troubles de la coagulation facilitant les thromboses. Il s'agit donc de souris avec un phénotype dommageable pour lesquelles un suivi quotidien sera réalisé par du personnel

qualifié pour réduire la souffrance. L'utilisation d'animaux est justifiée par le fait que le modèle décrit dans ce projet mime parfaitement la pathologie humaine avec une grande reproductibilité et correspond à l'introduction de la mutation présente chez les patients.

Le nombre total de souris nécessaires à ce projet est de 250 sur une période de 4 ans.

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, réduction et de raffinement (3R) :

-Remplacement : une étude clinique sera préalablement réalisée sur des prélèvements de patients atteints de TVC liée à un SMP. Elle permettra de guider les paramètres biologiques d'intérêt à doser chez la souris après validation du modèle.

-Réduction : Les différentes procédures animales ont été consciencieusement élaborées afin de réduire le nombre d'animaux utilisés tout en permettant la mise en place d'un modèle reproductible efficace de thrombose veineuse cérébrale.

-Raffinement : L'ensemble de la procédure expérimentale, et autres manipulations nécessitant une immobilisation seront conduites sur animaux anesthésiés pour réduire la souffrance, la douleur, l'angoisse. La prévention des douleurs post-opératoires se fera par injection de buprénorphine sous-cutanée et un suivi régulier des animaux (scoring). Tous les animaux seront euthanasiés 5 jours après l'induction de la thrombose cérébrale. Les prélèvements de tissus seront réalisés ensuite.

12366 Les maladies infectieuses sont fréquentes en élevage bovin, elles sont responsables de pertes économiques qui fragilisent les exploitations agricoles et impactent le bien-être des animaux. Le développement des connaissances sur l'immunologie des bovins est nécessaire pour améliorer les moyens d'intervention (dépistage des animaux infectés, prévention des maladies par la vaccination et l'amélioration des conditions d'élevage) permettant de réduire la fréquence et la sévérité des infections.

L'objectif du projet est d'acquérir de nouvelles connaissances sur les leucocytes sanguins (lymphocytes, monocytes, granulocytes) des bovins par l'étude de leurs caractéristiques et de leurs fonctions. Les études réalisées au laboratoire (in vitro) à l'aide des cellules isolées du sang d'animaux sains permettront d'obtenir des indications de base indispensables à l'étude ultérieure d'animaux infectés ou vaccinés. Ces études nécessiteront de prélever du sang sur des vaches laitières saines élevées en conditions conventionnelles. Un nombre de donateurs de sang suffisant pour la réalisation des travaux tout en évitant une fréquence élevée de prises de sang sera prévu. Chaque année, une douzaine d'animaux seront concernés, pour un total de 60 vaches laitières sur la période de 5 ans. Cette période est nécessaire car ces recherches ont un caractère évolutif, en fonction du développement des « outils » (matériels et réactifs) utilisés, et aussi en fonction de l'évolution des concepts et des questions scientifiques.

Le projet est conçu pour être en conformité avec les exigences 3R :

Remplacement : Comme chez l'homme, le prélèvement de sang est une méthode courante et peu invasive qui permet de ne pas porter atteinte à l'intégrité de l'animal.

Réduction : Deux groupes de 6 vaches seront suffisants chaque année du projet pour obtenir un nombre suffisant d'échantillons de sang sans imposer une répétition excessive des prises à chaque animal donneur.

Raffinement : Les prises de sang réalisées à la veine jugulaire ne nécessitent qu'une contention minimale, les animaux étant habitués à être pris au cornadis pour la distribution des aliments. La douleur causée par l'aiguille ne nécessite pas d'anesthésie. Les animaux sont maintenus dans leur environnement habituel.

12367 Chez l'humain, la vue envoie approximativement 70% des informations que le cerveau perçoit du monde extérieur. Ces informations sont captées par les cellules photoréceptrices de la rétine située au fond de l'œil. Elles initient ensuite une succession de messages électriques qui sont envoyés à travers la rétine, le nerf optique jusqu'au cerveau et créent une image. 285 millions de personnes

dans le monde souffrent à des degrés variés de perte de vision jusqu'à la cécité complète. Une des causes importantes est le glaucome, qui est la seconde cause de cécité dans le monde avec plus de 4,5 millions de patients. Sa prévalence est de l'ordre de 5-6% chez les plus de 60 ans. L'incidence du glaucome ne cesse d'augmenter en raison du vieillissement de la population et on estime que plus de 80 millions de personnes pourraient être atteintes à l'horizon 2020. Le glaucome provoque la mort des neurones ganglionnaires de la rétine dont les prolongements (appelés axones) constituent le nerf optique, l'unique voie de sortie des informations visuelles vers le cerveau. Ainsi, dans le glaucome, la rétine est toujours fonctionnelle mais se retrouve progressivement déconnectée du cerveau. Le dépistage des patients est souvent tardif et intervient alors que la vision est déjà irrémédiablement altérée. Parmi les autres maladies cécitantes, les dégénérescences rétiniennes ont en commun la dégradation, puis la mort des cellules photoréceptrices de la rétine. Lorsque les cellules photoréceptrices dysfonctionnent, l'image devient floue, distordue ou ne peut plus se former. Ces maladies affectent plus de 170 millions de personnes dans le monde mais pour les mêmes raisons que le glaucome, leur nombre est en perpétuelle augmentation. Les dégénérescences rétiniennes les plus connues sont la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et Retinitis Pigmentosa. La complexité de la vision est telle qu'elle ne peut être abordée que chez l'animal vivant. Le modèle souris permet en plus des modifications génétiques permettant d'étudier le rôle d'un gène donné.

Le projet vise comprendre comment DCC intervient dans le développement de la rétine. Le nombre total de souris utilisées dans ce projet sera de 144 pour 5 ans et les diverses procédures expérimentales. Lorsque les souris proviennent de l'extérieur, une période d'acclimatation de 5 jours est observée avant de les faire entrer en expérimentation. Tout au long des procédures, les souris de même sexe restent hébergées en groupe.

En respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R », 1) Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. De plus, une grille de suivi des animaux a été mise en place pour éviter toute souffrance potentielle (points limites). Tous les animaux auront à leur disposition des carrés de cellulose, une maisonnette, des bâtons à ronger ainsi que de la nourriture et boisson à volonté. 2) Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre objectif scientifique du projet. 3) La complexité de la régénération axonale et de la dégénérescence rétinienne est telle que les études ne peuvent se faire in vitro.

12368 L'immunothérapie bouleverse la prise en charge de maladies graves chez l'homme, comme les cancers, les maladies auto-immunes et les maladies infectieuses. Cette stratégie thérapeutique mobilise les défenses immunitaires du patient contre sa maladie. Elle requiert de nouveaux médicaments qui sont la plupart du temps d'origine biologique et nécessitent, au cours de leur développement, d'être évalués dans une espèce très proche de l'homme : le primate non humain (PNH). Le système immunitaire et la physiologie des PNH sont suffisamment proches de celles de l'homme pour obtenir des données les plus pertinentes et prédictives possible de l'innocuité et de l'efficacité de nouvelles stratégies d'immunothérapie chez l'homme. Seules les stratégies les plus avancées seront évaluées chez le PNH, après avoir été testées in vitro et chez d'autres espèces. Au cours des 5 années que durera ce projet, différentes stratégies d'immunothérapie seront évaluées chez le PNH, en deux phases : dans un premier temps, validation du concept sur un nombre minimal d'animaux et dans un second temps, évaluation de l'innocuité et de l'efficacité sur un nombre d'animaux plus important permettant une analyse statistique. Il n'est pas prévu de transférer ou d'induire des tumeurs chez ces animaux. Les PNH, immunisés contre des antigènes modèles, seront traités par les immunothérapies à tester (par exemple des inhibiteurs de point de contrôles immunitaires, un ciblage de sous-population cellulaire, l'induction d'un climat tolérogène ou l'induction de cellules immunitaires régulatrices, la déplétion d'anticorps) : la tolérance du traitement sera évaluée, ainsi que sa capacité à modifier la réponse immunitaire vis-à-vis de l'antigène modèle.

Le projet prévoit au maximum, sur une durée de 5 ans, 98 PNH nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'exploitation optimale des données. Les méthodes expérimentales sont raffinées et réfléchies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : traitements et prélèvements sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. Des échantillons biologiques produits dans ce projet seront conservés afin de limiter le recours au modèle PNH. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés en groupe dans des modules contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement de leur milieu de vie défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

12369 A l'échelle mondiale, la tuberculose est un problème majeur de santé publique. Les infections liées à *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) représentent chaque année, 12 millions de personnes atteintes, dont 3,9 millions sont contagieuses. En 2016, le nombre de décès dus à la tuberculose était estimé à 1,7 millions. Si l'on ne fait rien contre la tuberculose au cours des vingt prochaines années, près d'un milliard de personnes supplémentaires seront infectées, 200 millions contracteront la maladie et 35 millions en mourront.

En outre, on observe chaque année 630 000 cas de tuberculose résistante aux traitements. Ces formes de la maladie sont observées en majorité en Europe de l'Est et dans certaines provinces de Chine, en Afrique et en Amérique du Sud. Il est donc urgent de relancer activement la recherche pour des médicaments plus efficaces, simples d'utilisation et, surtout, à la portée des malades des pays en voie de développement. Notre objectif est donc de fournir des médicaments innovants, de réduire le temps de traitement actuellement de 6 mois et de trouver des solutions de santé adaptées pour combattre la menace grandissante de la tuberculose.

Dans l'approche des traitements des maladies infectieuses, le développement de modèles de pharmacologie *in vivo* demeure indispensable. En effet les tests *in vitro*, effectués préalablement pour valider l'intérêt de la cible, ne permettent pas d'appréhender les mécanismes d'action de l'infection et les interactions hôte (le patient) / pathogène (la bactérie). La diversité des stades cliniques de tuberculose (latent, active) nécessite le développement de différents modèles animaux pour simuler la physiopathologie associée à ces formes cliniques.

La caractérisation de certaines cibles cellulaires impliquées dans l'immunité peut également entraîner l'utilisation de souris transgéniques.

Au total 3 600 rongeurs seront utilisés par an représentant 18 000 rongeurs pour 5 ans soit 17 000 souris et 1 000 rats pour 5 ans.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Aucune méthode évitant totalement le recours à l'animal selon les exigences réglementaires des pays destinataires des produits n'est développée à ce jour pour les procédures expérimentales décrites.

Réduction :

Le schéma expérimental des tests de ce projet a fait l'objet d'une revue par des biostatisticiens afin de calculer au plus juste le nombre d'animaux à utiliser tout en permettant un support au dossier réglementaire CTD (Common Technical Document).

Raffinement

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des dispositifs d'enrichissement, dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé et compétent. Des points limites sont mis en place pour limiter la souffrance des rongeurs.

12370 Les cancers sont la seconde cause de mortalité chez les enfants âgés de 1 à 15 ans dans les pays industrialisés. Parmi eux, les cancers cérébraux sont la deuxième cause de cancer pédiatrique et la cause majeure de mortalité liée au cancer.

La radiothérapie est nécessaire et souvent curative pour traiter les tumeurs cérébrales pédiatriques. Cependant, elle est associée à une forte toxicité sur le cerveau en développement entraînant des effets secondaires dramatiques chez les enfants (défauts neurocognitifs sévères, perturbations neuro-endocrines, etc). Chez certains patients, la radiothérapie échoue et des récurrences tumorales apparaissent suggérant une forme de radiorésistance de ces tumeurs.

Chez les très jeunes enfants, le médulloblastome (MB) et les tumeurs rhabdoïdes et térétoïdes atypiques (ATRT) sont parmi les cancers cérébraux les plus agressifs. En outre, ils sont souvent associés à une rechute et ce malgré d'intensifs traitements classiques associant chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie.

Ce projet a pour but de trouver de nouvelles modalités de traitement qui amélioreront le contrôle de la tumeur et diminueront les effets secondaires indésirables. Des études préliminaires in vitro ont montré des résultats prometteurs. Cependant, elles ne permettent pas de répondre complètement à la question d'où la nécessité d'utiliser le modèle animal. Ceci nous permettra d'étudier la progression tumorale dans un contexte pathologique proche de celui observé chez l'homme.

Dans ce projet, nous testerons 2 approches innovantes : 1/ des molécules thérapeutiques potentiellement radiosensibilisantes combinées à la radiothérapie, et 2 /de nouvelles méthodes de radiothérapie. Certaines de ces approches ont déjà été testées sur des tumeurs chez la souris adulte et ont montré des résultats encourageants.

Nous étudierons leur efficacité sur la régression tumorale et leur toxicité à court terme sur les tissus sains en développement chez le jeune souriceau et, à long terme, chez la souris adulte. De plus, du fait de la récurrence de certaines tumeurs suite aux traitements, nous étudierons les mécanismes de radiorésistance tumorale.

Dans l'optique de minimiser au maximum le nombre d'animaux utilisés dans chaque procédure, nous utiliserons un système d'imagerie non invasif pour suivre la croissance tumorale.

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être. Pour limiter la douleur, les contentions seront douces, les procédures se feront sous anesthésie générale et sur coussin chauffant et les réveils après opération se feront sous lampe chauffante et sous surveillance. Si des signes cliniques de souffrance sont observés chez les souris opérées, des analgésiques seront utilisés pour diminuer leurs maux et les souris seront euthanasiées en cas de persistance des signes cliniques anormaux.

L'ensemble de ce projet requiert un nombre total d'animaux estimé au maximum à 16980 souris.

12371 L'anaphylaxie est une réaction allergique grave, aiguë qui peut causer la mort. Elle survient lorsqu'une personne allergique est exposée à son allergène particulier (substance capable de provoquer une réaction allergique) tels que des aliments, les piqûres d'insectes, certains médicaments ou le latex. Les symptômes peuvent être cutanés, respiratoires et cardiovasculaires et peuvent mettre la vie en danger. En raison de l'imprévisibilité de l'évènement et sa rareté, les observations cliniques sont difficilement exploitables.

Si les principaux acteurs cellulaires responsables de l'anaphylaxie ont été identifiés, le rôle des plaquettes sanguines reste méconnu. Les plaquettes sanguines jouent un rôle vital dans le maintien de l'intégrité vasculaire et l'arrêt des saignements mais leur rôle dans l'anaphylaxie a peu été étudié. De plus, les interactions cellulaires, qui sont clé dans l'anaphylaxie, ont principalement été étudiées in vitro, sur cellules isolées. Hors, in vitro, on ne reproduit pas la complexité des mécanismes qui se produisent in vivo lors du choc anaphylactique. A ce jour, aucune étude n'a examiné in vivo la réaction anaphylactique, au sein des organes, en temps réel, chez la souris.

Nous proposons d'utiliser un modèle d'anaphylaxie chez la souris anesthésiée pour visualiser in vivo, en temps réel par microscopie multiphoton, les mécanismes de l'anaphylaxie dans les poumons des souris en identifiant les cellules engagées, les interactions intercellulaires et leur dynamique. Ces observations sont essentielles pour mieux comprendre les mécanismes responsables du choc anaphylactique, en particulier le rôle des plaquettes sanguines.

Réduire: Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés (8 souris/groupe), avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire et dans la mesure du possible, dans les expériences qui l'exigent, les tissus seront prélevés sur les mêmes animaux.

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure de papier pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Les souris sont maintenues en groupe sociaux.

Toutes les procédures invasives (injections, chirurgie) seront réalisées sous anesthésie générale. Une fiche de suivi sera mise en place afin de pouvoir contrôler l'état des animaux lors du protocole expérimental (points limites). Les souris ne seront pas réveillées à l'issue de la chirurgie et de l'induction du choc anaphylactique. La durée maximale de l'expérimentation est de 2h.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont pris en charge par du personnel compétant et entraîné.

Remplacer : Le recours à l'utilisation d'animaux est justifié par le fait que les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régissent le choc anaphylactique sont difficiles, voire impossible à étudier chez l'homme, vue l'imprévisibilité de l'évènement et sa rareté.

Nombre d'animaux: cette étude nécessitera au maximum l'utilisation de 632 souris.

12372 L'objectif principal de ce projet est de mieux comprendre comment la rétine et les cartes visuelles se forment au cours du développement pour assurer une correcte représentation du monde extérieur. Comprendre comment les connexions sont établies et raffinées au cours du développement cérébral est crucial pour appréhender et prévenir les défauts se produisant au cours des pathologies neurodéveloppementales. De plus, l'établissement correct du système visuel étant crucial pour une vision adéquate, les résultats de nos recherches permettront de mieux comprendre les défauts visuels se produisant dans certaines pathologies visuelles ou oculomotrices comme l'albinisme, l'amblyopie, le strabisme et le nystagmus. Ce projet a l'avantage de combiner des approches variées de génétique de la souris, une technique d'électroporation permettant l'expression de molécules d'intérêt dans la rétine ou dans le cerveau avec de la culture cellulaire, du traçage neuronal et des méthodes histologiques pour déterminer le rôle de ces gènes dans la formation et le raffinement des cartes visuelles. Nous avons détecté des défauts de projections visuelles chez certaines lignées mutantes et cherchons à les caractériser plus précisément afin de comprendre le lien entre le gène délété et la conséquence phénotypique sur les projections visuelles et donc la fonction de ce gène.

Nous étudions principalement l'organisation des projections rétinienne dans le cerveau de souris, qui est trop complexe pour être entièrement modélisé in vitro par culture cellulaire. Afin de réduire au maximum l'utilisation d'animaux, nous avons développé la technique d'électroporation (in utero) pour marquer les axones rétinien et également inactiver ou surexprimer des gènes de manière locale et aiguë dans la rétine ou le cerveau chez la souris. Cette technique a l'avantage d'être rapide et de réduire le nombre de souris nécessaire par comparaison aux méthodes classiques de génération de lignées de souris mutantes. Des travaux précédents nous ont permis de valider les techniques d'inactivation et donc de minimiser le nombre d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique la condition mutante à la condition contrôle. Pour ce projet, nous pensons utiliser 1922 animaux répartis entre souris contrôles, souris avec mutation spontanée et souris transgéniques. Grâce à cette méthode nous testerons le rôle de différents gènes dans la formation du système visuel.

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

12373 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des neurones produisant de la dopamine situés dans une région du cerveau appelée la substance noire. La dopamine est un neurotransmetteur essentiel pour le contrôle des mouvements volontaires et des fonctions cognitives telles que les apprentissages, la planification des actions, le contrôle inhibiteur ou encore la flexibilité comportementale. Le traitement de la maladie de Parkinson est basé sur l'utilisation d'agonistes dopaminergiques qui ont pour but de pallier au manque de dopamine consécutif à la perte des neurones dopaminergiques. Cependant ce traitement entraîne des effets secondaires appelés troubles du contrôle des impulsions qui se manifestent par des addictions comportementales telles que les achats compulsifs, ou des comportements stéréotypés complexes. Les mécanismes responsables de ces effets secondaires sont mal connus mais les études d'imagerie chez l'homme suggèrent une implication du cortex préfrontal, région impliquée dans les fonctions exécutives et des structures sous-corticales comme le striatum impliquées dans la réalisation des actions.

Le but de ce projet est de déterminer dans un modèle de maladie de Parkinson chez le rat si une altération de la communication neuronale entre le cortex préfrontal et le striatum pourrait être responsable du développement des effets secondaires des traitements pharmacologiques de la maladie de Parkinson. Pour cela, nous enregistrerons l'activité des neurones du striatum suite à une stimulation du cortex préfrontal chez des animaux contrôles ou ayant une lésion du système dopaminergique. Nous évaluerons également l'impact du traitement antiparkinsonien sur la communication neuronale. En parallèle nous évaluerons le comportement d'amasement de nourriture chez le rat afin de disposer d'un index comportemental de comportement stéréotypé complexe (tel que développé par les patients) et qui pourra être corrélé aux résultats des enregistrements électrophysiologiques.

Ce projet utilisera 276 rats et sera réalisé en application de la règle des 3R: (1) Remplacer: Ces approches analysant le comportement de l'animal et la communication entre différentes régions du cerveau, il n'est pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier. (2) Réduire: (i) nous avons rédigé un protocole expérimental rigoureux et réduit au maximum le nombre d'animaux en planifiant uniquement des expériences absolument nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques, (ii) en effectuant des mesures répétées, (iii) en utilisant des tests statistiques performants : ANOVA multi factorielle suivi de tests "post-hoc" de comparaison de moyennes de deux échantillons avec ajustement de l'erreur. (3) Raffiner: (i) nous avons planifié nos expériences en apportant une attention particulière pour réduire sinon soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux. Des points limites sont définis pour éviter toute souffrance potentielle. Pour l'analyse du comportement, nous utiliserons un test de comportement d'amasement basé sur le comportement naturel de l'animal qui ne requiert aucune intervention directe de l'expérimentateur.

12374 Les médicaments vétérinaires donnés aux animaux pour garantir leur bonne santé, contribue à la pollution des écosystèmes et à l'émergence de résistances aux traitements médicamenteux, en particulier les antiparasitaires. Des méthodes alternatives doivent donc être recherchées. Chez les herbivores, les nématodes gastro-intestinaux sont ingérés en même temps que l'herbe et provoquent un affaiblissement général de l'animal plus susceptible aux maladies, de même qu'un coût supplémentaire pour l'éleveur (achat de vermifuge). Une solution pour lutter contre ce parasitisme, tout en réduisant l'utilisation de médicaments, est de sélectionner les animaux pour la résistance aux parasites. Dans cette étude nous comparons deux lignées de moutons génétiques résistantes (R) ou sensibles (S) aux nématodes gastro-intestinaux qui seront infestées à différents

stades physiologiques. Soixante-dix-sept brebis sont concernées et 100 agneaux seront suivis afin d'évaluer l'impact des infestations parasitaires des mères sur les descendants.

La règle des 3 R est suivie comme suit:

- Remplacer :

On ne peut pas remplacer l'hôte (pour cette étude : la brebis) pour la réalisation du cycle parasitaire et l'étude de l'impact de la sélection à la résistance aux parasites. Par ailleurs la sélection génétique n'est réalisable que sur des animaux.

- Réduire :

Le nombre d'animaux prévus dans l'expérimentation a été limité au maximum pour avoir un effectif garantissant l'interprétation des données.

- Raffiner :

Les brebis et leurs agneaux seront hébergés sur une litière paillée et en lots de manière à pouvoir exprimer leurs comportements sociaux. Elles seront habituées à être manipulées et les prélèvements seront réalisés par du personnel expérimenté. Le milieu sera enrichi par la présence de disques à mordiller. Les prélèvements coprologiques seront réalisés avec un gel lubrifiant et la contention de l'animal sera réalisé par du personnel habilité et expérimenté. Les prises de sang et la contention attenante seront réalisées également par du personnel habilité et expérimenté. Une récompense sous forme d'aliment concentré sera distribuée à l'issue des prélèvements. Les animaux seront observés quotidiennement afin d'évaluer toute altération de l'état général (points limites).

12375 Résumé non technique

Notre organisme doit réguler beaucoup de réactions chimiques afin de permettre notamment la digestion et la régulation du taux de sucre. Ces réactions se déroulent dans le foie, l'intestin et le pancréas. Dans le pancréas, les cellules bêta sont responsables de la sécrétion d'insuline, hormone qui permet la régulation du taux de sucre dans le sang (glycémie). Le défaut de régulation de la glycémie entraîne le diabète, une maladie touchant 285 millions de personnes dans le monde en 2010 (438 millions attendus en 2030). Toute nouvelle information pouvant conduire à la meilleure connaissance de cette maladie est donc primordiale.

Le mécanisme de régulation de la glycémie est très complexe et fait intervenir de nombreux partenaires.

Nous étudions plus particulièrement le rôle de 2 protéines importantes dans les premières étapes de la production d'insuline et de sa sécrétion dans le système sanguin.

Lorsque la première protéine, HNF4A, n'est pas fonctionnelle, un diabète de type MODY1 (Maturity Onset of Diabetes in the Young) apparaît. HNF4A n'agit pas de manière autonome mais en collaboration avec plusieurs autres facteurs dont TAF4.

Le laboratoire d'accueil a mis en évidence une interaction physique et fonctionnelle entre HNF4A et TAF4. Cette interaction est essentielle au métabolisme hépatique normal chez la souris. L'objectif de ce projet est de caractériser le rôle de l'axe HNF4A-TAF4 dans la régulation du métabolisme dans les cellules bêta pancréatiques adultes. Ce projet sera l'objet d'un travail de thèse concernant l'inactivation du gène codant TAF4 dans les cellules bêta pancréatiques adultes. L'effet de la perte de TAF4 sera évalué par des analyses tissulaires, moléculaires et fonctionnelles/métaboliques et son rôle dans l'interaction avec HNF4A sera étudié.

REMPACEMENT: Les expériences d'inactivation de TAF4 ont été réalisées sur des cellules en culture in vitro ; ce modèle présente cependant des limites, dans la mesure où les signaux entre les différents types cellulaires ne peuvent être étudiés. Aucun modèle d'étude de la glycémie in vitro n'est actuellement disponible. Il convient donc de réaliser l'étude dans un modèle animal, la souris étant le modèle le plus adapté.

REDUCTION: Le nombre total de souris expérimentales sera de 400. Cet effectif correspond au nombre d'animaux nécessaires afin que les résultats obtenus soient exploitables et reproductibles, soit statistiquement valides.

Par ailleurs, plusieurs expériences sont réalisées sur la même cohorte de souris afin de réduire le nombre total de souris nécessaires.

RAFFINEMENT: L'inactivation de TAF4 dans le pancréas ne devrait pas avoir d'effet délétère toutefois nous suivrons journalièrement l'état des souris après inactivation afin de détecter tout effet dommageable. Les souris seront hébergées en cohorte afin de conserver l'interaction sociale. En cas de souffrance liée au phénotype, les animaux seront suivis régulièrement et des points limites appliqués le cas échéant.

12376 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie de la rétine provoquée par une dégénérescence progressive de la macula, partie centrale de la rétine, qui apparaît le plus souvent à partir de 65 ans. En France, environ 1,5 millions de personnes seraient atteintes de DMLA. C'est la principale cause de cécité non corrigeable chez les personnes âgées dans les pays industrialisés. Les causes précises de cette maladie ne sont pas totalement connues et les mécanismes mal compris ; cependant nous savons que le système immunitaire joue un rôle important dans cette pathologie. Un défaut de l'aptitude de l'épithélium pigmenté rétinien (ERP) à éliminer les monocytes (sous classe de globules blancs) de l'espace sous rétinien joue un rôle important dans l'évolution de la DMLA.

Le but de ce projet est de trouver des molécules thérapeutiques qui permettraient de donner à l'EPR la capacité à éliminer l'accumulation des monocytes de l'espace sous rétinien afin de ralentir voire de stopper l'évolution de la DMLA.

Au total 1200 souris seront nécessaires à cette étude en incluant les contrôles.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale gazeuse et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permet une observation adaptée des animaux pour s'assurer de leur bien-être (points limites).

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir obtenir suffisamment de données statistiquement significatives et atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». Les études in vitro qui peuvent l'être ont déjà été effectuées.

12377 Le syndrome de Bartter est une maladie rare qui s'associe à une perte rénale de chlorure de sodium et une hypotension. L'utilisation d'indométacine (anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, permet de résorber la plupart des troubles associés à ce syndrome. Le mécanisme expliquant l'effet bénéfique de l'indométacine n'est pas bien connu dans cette maladie. La première partie de ce projet a pour objectif de mieux caractériser un modèle murin d'inactivation d'un canal chlore et essayer d'améliorer la survie de ce modèle en utilisant les mêmes traitements que chez l'homme (utilisation d'anti-inflammatoires et compensation de la perte en sel). Ce projet permettra également de mieux comprendre les mécanismes qui entraînent une synthèse accrue de prostaglandines dans le syndrome de Bartter.

La souris est le seul modèle animal dont l'inactivation génique est particulièrement bien caractérisée. Ceci en fait un modèle de choix pour étudier l'implication d'une voie de transduction, une protéine ou un système hormonal dans la régulation physiologique de la balance sodée et de l'état acido-basique. Le recours à des méthodes alternatives a été envisagé en particulier des modèles cellulaires. Il n'existe pas de bon modèle cellulaire pour les cellules rénales.

Nous estimons au total que 696 souris seront nécessaires afin de faire cette étude comportant 3 procédures pour un programme de recherche de 5 ans. Nous adapterons le nombre d'animaux à la baisse dans le respect de la règle des 3R si les protocoles ou les résultats de nos expériences le

permettent. Un enrichissement de l'environnement des animaux sera également entrepris. Nous limiterons au maximum le stress et l'angoisse des animaux grâce à des points limites suffisamment précoces. L'expérience sera interrompue si ces points limites sont atteints.

12378 Le système du complément fait référence à un ensemble de protéines sériques qui coopèrent avec l'immunité innée et adaptative pour éliminer les pathogènes. Depuis longtemps, le système du complément a été considéré comme étant une première ligne de défense immunitaire contre le cancer en s'activant à la surface des cellules tumorales. Cependant, les cellules tumorales développent des mécanismes induisant une inhibition de la voie terminale de la cascade du complément en échappant ainsi à l'effet cytotoxique médié par ce système. De récentes études ont démontré que l'activation du complément au sein du microenvironnement tumoral peut promouvoir le développement du cancer. L'activation du complément peut induire un état d'inflammation chronique, favoriser un microenvironnement immunosuppresseur, stimuler l'angiogenèse et activer des voies de signalisations favorables au développement tumoral. Les mécanismes liés à ces phénomènes sont encore mal compris. L'objectif de ce projet est d'analyser *in vitro* et *in vivo* le rôle du complément dans la progression tumorale. Nous aborderons ces questions par des études sur des modèles cellulaires *in vitro* et *in vivo* par des études de développement tumoral. D'une part, nous utiliserons des souris NSG immunodéficientes dans lesquelles nous injecterons des cellules tumorales humaines rendues déficitaires pour un régulateur de la cascade ou le surexprimant. D'autre part, nous étudierons le rôle de cette protéine d'origine hépatique en utilisant des souris C57BL/6 WT ou déficitaires.

Les résultats de ce projet permettront l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques parmi les composants du système du complément. Les expériences *in vitro* utilisant des lignées cellulaires tumorales ont été réalisées et utilisées pour la mise en place, afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser dans ce projet d'expérimentation. Les applications *in vitro* ne permettent pas de répondre entièrement à nos objectifs car des cellules isolées ne peuvent refléter la complexité du système immunitaire, de la vascularisation et du microenvironnement tumoral. L'expérimentation animale est ainsi nécessaire afin d'étudier ces interactions complexes au sein d'une tumeur et de chercher des cibles thérapeutiques. Chaque expérimentation sera raffinée afin d'obtenir un maximum de résultats de chaque animal (taille tumorale, infiltrat immunitaire, prélèvement de la tumeur). Dans la réalisation de ce projet, les procédures expérimentales ont été mises au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement (3R) pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum* ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Ce projet d'une durée de 5 ans nécessitera l'utilisation de 280 souris.

12379 Il a été postulé que l'émergence des vertébrés a été rendue possible par l'acquisition de la crête neurale, qui en permettant le développement des structures complexes de la tête a conféré un avantage évolutif. De ce point de vue, consécutivement à l'acquisition de la crête neurale il nous faut souligner la contribution cruciale d'un de ses dérivés -la gaine de myéline- au succès des vertébrés. En l'absence de cette structure, les vertébrés tels que nous les connaissons n'existeraient pas. Malheureusement, la destruction de cette gaine protectrice des axones dans certaines circonstances pathologiques, dont la plus fréquente est la Sclérose en plaques (SEP), a des conséquences dramatiques évoluant progressivement vers un handicap permanent. Bien qu'un certain degré de remyélinisation spontanée est observé dans la SEP, il y a de sérieux arguments montrant que beaucoup de lésions de SEP restent démyélinisées, malgré la présence plus ou moins

abondante dans le voisinage de ces lésions de cellules du lignage oligodendrocytaire, la cellule myélinisante du système nerveux central. Qu'est-ce qui empêche ces cellules de remyéliniser ? Est-ce l'absence sur les axones de signaux attractifs, ou bien les axones expriment-ils à leur surface des signaux inhibiteurs de la (re)myélinisation ? Alternativement est-il concevable que certains signaux inhibent le programme de myélinisation oligodendroglial ? L'ambition de notre projet de recherche est d'apporter des réponses à ces questions fondamentales en abordant ce problème sous un angle totalement innovant. La myéline est présente chez la vaste majorité des vertébrés. Au contraire, chez les insectes, les axones sont généralement entourés d'un seul prolongement glial (voir deux maximum) et ne sont pas myélinisés. Notre hypothèse de travail est que si nous pouvions briser le code permettant aux cellules gliales engainantes de la drosophile de former de multiples enroulements autour des axones nous ouvrirait la voie à des stratégies de réparation des lésions de SEP qui ne remyélinisent pas. Notre projet de recherche se propose de découvrir les conditions minimales à l'induction du programme de myélinisation. L'originalité de notre projet repose sur la spécificité de notre modèle expérimental qui associe une espèce non-myélinisée (la drosophile) et un vertébré myélinisé (le Xénope). Par ailleurs, les expériences de transplantation seront réalisées sur des têtards de la lignée MBP-GFP-NTR. Dans cette lignée il est possible de créer une démyélinisation conditionnelle, afin de créer un environnement favorable pour l'intégration des cellules de Drosophile qui expriment des marqueurs fluorescents rouge. Nous estimons que la réalisation de ce projet nécessitera au minimum 360 têtards de la lignée transgénique MBP-GFP-NTR. Afin de respecter la règle des 3R, nous favoriserons les accouplements naturels, plutôt que les fécondations in vitro, ce qui permet d'éviter d'avoir à prélever les testicules. Pour les expériences de transplantation elles seront réduites au minimum nécessaire pour démontrer l'intégration des cellules de Drosophile dans l'environnement Xénope. Il faut noter que grâce à la transparence des têtards, la progression de la myélinisation pourra être suivie longitudinalement sur les mêmes animaux sans qu'il soit nécessaire de les euthanasier à intervalles réguliers, afin de suivre par histologie la progression après transplantation. Par ailleurs, les tests fonctionnels permettront de tester l'efficacité de la remyélinisation obtenue sans avoir à réaliser des expériences d'histologie notamment pour la microscopie électronique. Par ailleurs, nous développons actuellement des co-cultures de cellules neurales de drosophile et de Xénope, afin de manipuler ces deux systèmes plus aisément que par transplantation in vivo.

12380 Le microbiote intestinal représente l'ensemble des bactéries et microorganismes de notre tube digestif et modère le système immunitaire de l'hôte. La cohabitation avec le microbiote nécessite un équilibre permanent, faisant intervenir notamment la perméabilité intestinale. Certains processus physiologiques (vieillesse) ou pathologiques (cancer) s'accompagnent d'une augmentation de la perméabilité intestinale dont les conséquences pour la santé humaine sont importantes (inflammation, amaigrissement et augmentation de la mortalité). Le maintien de la perméabilité intestinale nécessite entre autres mécanismes le processus d'autophagie au niveau des cellules épithéliales intestinales. Le but de ce projet est de développer un modèle permettant d'étudier la perméabilité intestinale de manière non invasive afin dans un second temps d'étudier l'impact du vieillissement, du cancer et du microbiote sur la perméabilité intestinale. Pour cela, une nouvelle méthode d'évaluation de la perméabilité intestinale par adjonction d'un colorant bleu alimentaire dans l'eau de boisson, déjà mise en place chez la drosophile et certains poissons, sera effectuée chez la souris de manière à obtenir une méthode d'évaluation non invasive de la perméabilité intestinale. Après une première étape de mise au point de cette technique, la perméabilité intestinale sera évaluée au moyen du colorant bleu et d'autres techniques complémentaires dans quatre situations distinctes: au cours du vieillissement normal de la souris ; dans un modèle de cancer pulmonaire ; après modification du microbiote ; en réponse à des traitements modulateurs de l'autophagie et des jonctions serrées identifiés au cours d'un screening in vitro. Les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les interactions entre microbiote, autophagie, perméabilité intestinale et cancer, dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de corriger le phénotype d'hyperperméabilité intestinale responsable d'une morbidité importante dans le cadre du cancer avancé et probablement au cours du vieillissement. L'étude de la perméabilité intestinale ne peut être réalisée qu'in vivo en raison des multiples facteurs mis en jeu (jonctions

serrées intercellulaires, architecture épithéliale et production de mucus, interactions avec le microbiote) qui ne peuvent être recréés que dans un modèle animal. L'étude sera stoppée si les expériences initiales sont négatives par rapport à l'hypothèse de travail. Nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de garder un nombre minimum d'animaux dans les groupes contrôles. Dans la réalisation de ce projet, qui dure 5 ans et qui compte au maximum 1732 souris immunocompétentes, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, des tunnels en cartons, et bâtonnets à ronger). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'un suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

12381 Une hémorragie sous arachnoïdienne correspond à la rupture d'un anévrisme développé aux dépens de la paroi d'une des artères intracrâniennes dans les espaces autour du cortex. Leur incidence varie de 2 à 22.5/100 000 habitants en fonction des régions du monde. Après le traitement de l'anévrisme, les patients entrent dans une période de 3 semaines à risque de survenue de nouveaux épisodes ischémiques, observé chez 20 à 40% de patients et pouvant conduire à un déficit neurologique irréversible voir au décès.

Un des mécanismes principaux des ischémies retardées est la survenue de dépolarisations corticales envahissantes se propageant lentement sur le cortex. Ces dépolarisations sont à l'origine notamment d'un œdème cellulaire. Afin que les cellules récupèrent leur état basal, il y a une consommation énergétique (de glucose et d'oxygène) très importante associée à une augmentation transitoire du débit sanguin cérébral local. Après une hémorragie sous arachnoïdienne le passage d'une dépolarisation peut conduire à une réaction vasculaire inverse : c'est-à-dire une baisse prolongée du débit sanguin cérébral jusqu'à la constitution d'une ischémie irréversible. Ce phénomène est appelé Spreading ischemia. Les modifications vasculaires lors des spreading ischemia ont été bien décrites, néanmoins leurs conséquences métaboliques et neurochimiques sont mal connues. De plus, lors de la survenue d'ischémie retardée l'efficacité des thérapeutiques instauré en soins intensif est limitée, et la manière d'améliorer l'état du cortex lors des spreading ischemia est inconnue.

L'objectif de ce projet consiste à enregistrer les changements de concentrations dans le cortex de métabolites (glucose, lactate, glutamate, D-sérine, oxygène ou potassium), du débit sanguin cérébral et de l'activité neuronale au moment et après le passage de SI, sur un modèle d'hémorragie sous arachnoïdienne chez le rat. Nous étudierons l'effet de l'hypertension artérielle contrôlée ou d'agent vasodilatateur afin d'augmenter le débit sanguin cérébral ; et la perfusion intraveineuse de lactate comme substrat énergétique accessoire. Ce projet de recherche fondamentale s'intègre dans un projet plus large de recherche translationnelle étudiant les dépolarisations corticales chez les patients présentant une lésion cérébrale aiguë.

Après une première phase de mise en place du modèle sur 10 animaux, ce projet 200 rats sur cinq ans. Nous utiliserons un animal par jour, pour une durée d'anesthésie de 6 à 8h sans réveil. 15% d'animaux supplémentaires pourront être commandé uniquement cas de problème expérimentaux. Un total de 240 maximum seront donc utilisés pour ce projet.

Conformité avec la règle des 3R :

Remplacement : Les techniques de monitoring continue ne sont actuellement pas disponibles chez l'homme. C'est pourquoi un modèle animal de SI a été choisi, ces phénomènes ne pouvant pas être modélisés ex-vivo.

Réduction : Nous allons monitorer deux régions : Une première où le cortex sera perfusé avec un mélange qui génère des SI ; une deuxième servira de contrôle. Nous avons ainsi divisé le nombre

d'animaux par deux, chaque animal étant son propre témoin. Les animaux utilisés dans la phase de mise en place du modèle pourront être utilisés comme contrôle réduisant d'autant le nombre d'animaux.

Raffinement : Chaque animal sera pesé et anesthésié puis une injection sous-cutanée d'analgésique et d'anesthésique local sera réalisée. L'homéostasie corporelle (températures, oxygénation, respiration, pression artérielle, hydratation...) sera monitorée en continu pendant toute la durée de l'expérimentation, et permettra d'adapter le niveau d'anesthésie et d'analgésie.

12382 Chez l'humain, la vue envoie approximativement 70% des informations que le cerveau perçoit du monde extérieur. Ces informations sont captées par la rétine située au fond de l'œil. Elles initient ensuite une succession de messages électriques qui sont envoyés à travers la rétine, le nerf optique jusqu'au cerveau et créent une image. 285 millions de personnes dans le monde souffrent à des degrés variés de perte de vision jusqu'à la cécité complète. Une des causes importantes est le glaucome, qui est la seconde cause de cécité dans le monde avec plus de 4,5 millions de patients. Sa prévalence est de l'ordre de 5-6% chez les plus de 60 ans. L'incidence du glaucome ne cesse d'augmenter en raison du vieillissement de la population et on estime que plus de 80 millions de personnes pourraient être atteintes à l'horizon 2020. Le glaucome provoque la mort des neurones ganglionnaires de la rétine dont les prolongements (appelés axones) constituent le nerf optique, l'unique voie de sortie des informations visuelles vers le cerveau. Ainsi, dans le glaucome, la rétine est toujours fonctionnelle mais se retrouve progressivement déconnectée du cerveau. Le dépistage des patients est souvent tardif et intervient alors que la vision est déjà irrémédiablement altérée. La complexité de la vision est telle qu'elle ne peut être abordée que chez l'animal vivant. Le modèle souris permet en plus des modifications génétiques permettant d'étudier le rôle d'un gène donné. Il est donc essentiel de pouvoir appréhender la biologie des neurones ganglionnaires de la rétine.

Le projet vise à comprendre comment les Plexines interviennent dans le développement de la rétine. Le nombre total de souris utilisées dans ce projet sera de 255 pour 5 ans et les diverses procédures expérimentales. Lorsque les souris proviennent de l'extérieur, une période d'acclimatation de 5 jours est observée avant de les faire entrer en expérimentation. Tout au long des procédures, les souris de même sexe restent hébergées en groupe.

En respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». 1) Avant injection dans l'œil, un d'anesthésique local est appliqué sur la cornée. Pendant l'intervention l'humidification de la cornée est assurée par quelques gouttes de sérum physiologique. Après l'injection, une application topique de pommade ophtalmologique maintient l'hydratation de l'œil. 2) Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Tous les animaux auront à leur disposition des carrés de cellulose, une maisonnette, des bâtons à ronger ainsi que de la nourriture et boisson à volonté. 3) Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. 4) La complexité de la régénération axonale et de la dégénérescence rétinienne est telle que les études ne peuvent se faire in vitro.

12383 En France, les quatre médicaments les plus consommés sont des analgésiques pour un coût annuel estimé à 1 milliard d'euros pour la société française. Dans le contexte actuel de la prise en charge médicamenteuse des douleurs, l'arsenal thérapeutique est extrêmement limité. Les patients atteints de douleur chroniques font face à un manque de solution thérapeutique poussant les médecins à la prescription d'opioïdes, induisant in fine des effets indésirables notamment liés à leur surconsommation. Il est donc primordial de pousser la recherche fondamentale vers la caractérisation de nouveaux agents thérapeutiques analgésiques. Le but de ce projet de recherche vise à mettre à jour les propriétés analgésiques des composés d'origine naturelle appartenant à la famille des terpènes. Les terpènes les plus petits, les monoterpènes, présentent l'avantage de pouvoir passer la barrière hématoencéphalique et constituent un réservoir de plus de 30 000 molécules non caractérisées pour leur effet analgésique, dont moins d'une trentaine ont à ce jour fait l'objet d'une caractérisation pharmacologique. D'autre part, les terpènes testés dans des

modèles de douleur chez l'animal semblent agir à deux niveaux d'intégration du système nociceptif : en périphérie directement au niveau des neurones sensoriels et sur les processus inflammatoire per se, en central par une modulation des systèmes endogènes de gestion de la douleur. Aussi, ce projet de recherche vise à caractériser le potentiel analgésique de plusieurs molécules terpéniques sur des modèles animaux de douleur inflammatoires et neuropathiques.

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer : les molécules sélectionnées ont été caractérisées au préalable in vitro pour leur activité et leurs caractéristiques physicochimiques. Cependant, l'évaluation de leur effet sur la nociception n'est réalisable aujourd'hui que sur l'animal entier.

Réduire : Compte tenu de la variabilité dans les différentes expériences prévues, le nombre d'animaux est limité à 10 par groupe, ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques.

Raffiner : Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie et analgésie. La température corporelle de l'animal sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté tout au long de la procédure. La douleur sera évaluée en post-opératoire grâce à une fiche de scoring permettant d'identifier des points limites parfaitement adaptés qui permettront d'interrompre la procédure pour limiter la souffrance animale. Les animaux sont hébergés en cohorte, dans un milieu enrichi, et observés quotidiennement par l'expérimentateur ou une personne compétente.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet : 480 rats Wistar

12384 Du fait des activités humaines, de nombreuses molécules synthétiques ou non se retrouvent dans l'environnement et notamment dans les milieux aquatiques. Parmi elles, certaines sont qualifiées de perturbateurs endocriniens (PE), c'est-à-dire qu'elles sont capables d'interagir avec le système endocrinien des organismes et d'induire des modifications de fonctionnement des cellules et organes.

De nombreux travaux ont mis en évidence les effets délétères des PE chez les organismes aquatiques adultes avec des altérations/perturbations de différentes fonctions fondamentales telles que la fonction de reproduction, la croissance, la prise alimentaire.... En revanche encore peu de données sont disponibles concernant les effets des PE durant les premiers stades de développement des organismes aquatiques et en particulier sur des espèces locales d'intérêt aquacole.

Le bar (*D. labrax*) du fait de son intérêt économique et du développement de l'aquaculture, est une espèce modèle très étudiée en termes de physiologie (reproduction, croissance, métabolisme...) et depuis quelques années, un modèle d'étude en écotoxicologie.

Le présent projet a donc différents objectifs : 1) développer un test larvaire chez le bar permettant l'étude de la toxicité chronique de contaminants ; 2) Evaluer les effets chroniques de molécules PE sur le comportement et l'architecture cérébrale des individus.

Pour la réalisation de ce projet, 2688 larves seront nécessaires ; l'optimisation des conditions d'élevage et le développement d'un test miniaturisé (en plaque) permettra de réduire un maximum le nombre d'animaux utilisés en assurant une reproductibilité et une robustesse au test. Les procédures utilisées suivront la règle des 3R, les animaux sont observés quotidiennement de manière à détecter et réduire le stress et la douleur. En cas de comportement natatoire anormal ou de malformation (points limites), les animaux seront euthanasiés.

12385 Le diabète dit "sucré" est une maladie liée à une défaillance des mécanismes biologiques de régulation de la glycémie. L'insulino-thérapie intensive est actuellement la meilleure thérapie permettant de maintenir la glycémie relativement stable et de retarder l'apparition des complications associées aux diabètes de type 1 et type 2 avancés. Néanmoins, un mauvais dosage de l'insuline administrée peut induire le développement d'hypoglycémies. A ce jour, le développement d'hypoglycémies est la principale complication des traitements par insulino-thérapie intensive.

L'objectif général de notre étude est de mettre en évidence un nouveau réseau neuronal pouvant participer à la contre-régulation, c'est à dire la lutte contre l'hypoglycémie. Dans une étude préliminaire, nous avons montré que les neurones à sérotonine (5-HT) du raphé dorsal (DRN) sont sensibles au glucose, activés en réponse à une diminution de la concentration en glucose. Ainsi, le but de ce projet est de déterminer si les neurones 5-HT du DRN participent à la modulation de la contre-régulation.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 360 souris sur une durée de 3 ans. L'étude de la contre-régulation ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles in vitro. Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre différents groupes. Toutes les précautions possibles (utilisation d'anesthésie, d'antalgique, habituation, ...) seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort et la souffrance des animaux.

12386 La prévalence du diabète de type 2 dans le département est 2 fois plus importante qu'en métropole et la surmortalité associée y est 3,5 fois plus importante. L'augmentation des facteurs de risque (obésité, surpoids, sédentarité, mauvaise alimentation) laisse présager une augmentation de la prévalence du diabète dans les années à venir. La neuropathie diabétique (ND) est l'une des complications chroniques les plus fréquentes du diabète. Elle concerne les atteintes du système nerveux périphérique, c'est-à-dire les nerfs sensitifs et moteurs ainsi que les nerfs du système nerveux autonome qui commandent nos organes. La ND perturbe considérablement la sensibilité à la douleur et au toucher. Chez certains patients, elle provoque des douleurs terribles reflétant une atteinte des neurones véhiculant les informations douloureuses. A plus long terme, la dégénérescence de ces neurones peut rendre indolore une simple blessure au pied qui peut facilement s'infecter et mener à une gangrène puis à l'amputation. Ces complications au niveau du pied ont une incidence économique et sociale très importante, avec un risque d'amputation multiplié par 10 à 15 chez les patients diabétiques. Actuellement, les thérapies utilisées pour le traitement des ND sont d'une part de rééquilibrer la glycémie (non efficace dans le cas du diabète de type 2) et d'autre part d'utiliser des molécules antidouleurs.

De nombreuses études se sont consacrées à l'impact de l'hyperglycémie dans le développement de la neuropathie mais très peu se sont intéressées au rôle de la dérégulation lipidique, autre paramètre généralement observé chez les patients diabétiques. L'objectif de cette étude est d'étudier l'impact d'une dérégulation du métabolisme lipidique sur le développement de la neuropathie. Pour cela, nous utiliserons différents modèles murins de perturbation du métabolisme lipidique: souris LDLR -/-, PCSK9 -/- et ApoE-/- . Ces animaux seront soumis à un régime riche en graisses (HFD : High Fat Diet) afin d'induire une neuropathie au cours du temps. Nous l'évaluerons en réalisant des tests sensoriels et moteurs. L'utilisation de modèles murins de ND est couramment utilisé en recherche et présente l'avantage de mimer les déficits sensoriels (perte de sensibilité tactile et douloureuse) et morphologiques (diminution de l'innervation au niveau de la peau) observés chez les patients. Ce projet nous permettra de mieux comprendre le rôle de la dérégulation du métabolisme lipidique dans le développement et la progression de la ND. Il pourrait permettre à plus long terme le développement de nouvelles thérapies afin de prévenir ou freiner le développement de la pathologie. Pour cette étude, nous utiliserons un maximum de 120 souris.

Nous serons particulièrement vigilants afin de développer nos protocoles dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Pour ce projet, le recours à l'expérimentation sur des animaux vivants est indispensable car la ND est impossible à reproduire sur des modèles in vitro simplifiés. Le modèle de ND est couramment utilisé chez la souris car elle permet de reproduire les déficits observés chez l'homme. Les études seront systématiquement optimisées d'après la littérature et/ou les observations réalisées au laboratoire.

Réduction : L'utilisation des animaux sera réduite au maximum et les expériences seront planifiées et réalisées les unes après les autres afin d'éviter des pertes inutiles. L'application de cette politique

de réduction mise en place permettra d'optimiser au mieux chaque expérimentation afin de retirer un maximum d'information d'un minimum d'animal.

Raffinement : Les protocoles sont réfléchis afin de réduire la douleur et la détresse de l'animal. Durant les opérations chirurgicales, les souris seront maintenues anesthésiées sous isoflurane à 1.5% sur un plateau chauffant afin d'avoir un état d'inconscience de qualité tout le long des manipulations et de prévenir toute hypothermie. Avant toute incision chirurgicale, les animaux bénéficieront d'une injection de buprénorphine (0,05mg/kg) afin de prévenir les douleurs per et post-opératoire. Chaque souris réveillée sera placée seule dans une cage propre bénéficiant d'enrichissement. En cas de signe de souffrance (prostration prolongée, comportement agressif, vocalisations) nous augmenterons la dose d'analgésique buprénorphine à 0.1mg/kg. En cas de points limites (décubitus latéral et/ou détresse respiratoire) la souris sera euthanasiée par dislocation cervicale. Les animaux seront sous la surveillance de personnes habilitées à manipuler les animaux et la diffusion par ces personnes de leur savoir-faire permettra de réaliser nos expérimentations dans le respect de l'animal et des conditions optimales du suivi des règles d'hygiène et de sécurité. Tous les animaux sont hébergés dans un service de zootechnie ayant un environnement enrichi qui a été agréé par le ministère.

12387 Notre équipe travaille sur les vecteurs (principalement de type moustique) et les maladies infectieuses qu'ils transmettent. Les maladies à transmission vectorielle représentent plus de 17% des cas de maladies infectieuses, et provoquent près d'un million de décès chaque année. De ce fait, un des objectifs de notre plateforme est d'utiliser les moustiques sur des projets de recherche dans divers domaines et notamment, sur l'évaluation de pesticides utilisés en santé publique dans le cadre d'expertise pour l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Le but de ce projet est de tester l'efficacité de moustiquaires via des tests en tunnel. C'est un test de référence qui permet de mesurer l'efficacité de moustiquaires imprégnées d'insecticide dans des conditions proches des conditions de terrain (cases africaines). En effet, les moustiquaires sont utilisées en Afrique afin de se protéger des moustiques pouvant transmettre le paludisme. Nous sommes amenés plusieurs fois dans l'année à réaliser ce type de test dans le cadre de nos activités. Cependant, les périodes de tests ne durent au maximum pas plus de 4 à 6 mois en cumulé par an. Le test consiste à introduire des moustiques dans le tunnel en verre séparé en deux par une moustiquaire en présence d'un animal qui va attirer les moustiques pendant la nuit.

Selon que les moustiques sont gorgés ou non, vivants ou morts et d'un côté ou de l'autre de la moustiquaire imprégnée, les résultats donnent :

- la mortalité due à l'insecticide ;
- le degré de protection individuelle (réduction du nombre de moustiques gorgés) ;
- le degré de protection collective (réduction du nombre de moustiques gorgés vivants).

Ce test donne une indication précise de la protection de la moustiquaire contre les moustiques.

Nous utilisons des cobayes comme attractant dans notre test, ils sont maintenus en contention afin de ne pas trop bouger pour éviter qu'ils n'écrasent les moustiques par mégarde, lorsque ces derniers se gorgent, ce qui entrainerait un biais dans les résultats. En effet, c'est au moment de la piqûre que les femelles moustiques peuvent transmettre des pathogènes. Cependant, nous n'empêchons pas complètement les cobayes de bouger parce que la durée de contention est longue. Les animaux en contention ne sont pas surveillés durant la période de test car celui-ci doit se dérouler pendant la nuit et le fait de rentrer dans la pièce biaiserait les résultats (présence d'une autre source de sang, flux d'air...). Mais, un même cobaye n'est utilisé qu'une seule fois par semaine au maximum afin de minimiser le stress engendré par la contention. De plus, les cobayes ne sont pas en contact avec les moustiquaires imprégnées d'insecticides. Aucun stress chronique ou mortalité due au stress pendant la manipulation n'ont été observés jusqu'à présent. Or le laboratoire utilise ce protocole depuis plus de dix ans.

Nous utilisons 4 cobayes par test. Nous avons 3 lots de 4 cobayes ce qui permet de réaliser jusqu'à trois tests/semaine mais de n'utiliser les cobayes qu'une seule fois/semaine lors des périodes de

tests. Nous les gardons 3 ans pour l'utilisation de tests, ce qui fait que nous avons besoin de 24 cobayes au total sur toute la période du projet.

Il n'existe à ce jour pas de système de remplacement artificiel (attractant chimique) qui simule réellement la présence d'un animal dans ce type de système. Les tests terminés, les cobayes sont remis en groupe dans leur cage d'hébergement avec eau, vitamines, granulés et foin et l'animalerie est contactée pour venir les récupérer. Les cobayes sont conservés aussi longtemps que possible et sont euthanasiés s'ils présentent des signes de stress chronique ou s'ils deviennent trop vieux.

12388 Ce projet consiste à évaluer les effets de différents candidats médicaments sur les paramètres cardio-vasculaires chez le rongeur éveillé ou anesthésié, normotendu ou hypertendu.

Au cours de chaque étude, les rongeurs seront traités avec le candidat médicament testé à différentes doses ou avec un véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée (traitement unique ou chronique). La mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque chez l'animal vigile ou anesthésié permettra d'évaluer le profil hémodynamique des différents composés.

D'autres évaluations pourront être réalisées sur ces mêmes animaux comme par exemple une étude préalable de la fonction rénale, des évaluations pharmacocinétiques, des échographies cardiaques.

Un nombre prévisionnel maximum de 1680 animaux sera utilisé dans ce projet (1400 rats et 280 cobayes).

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R:

Remplacement : dans le cadre du développement de certains nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'un candidat médicament sur la fonction cardiovasculaire. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'une molécule. A ce jour, le rat et le cobaye sont les espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le suivi des signes cliniques et des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

12389 La consommation de poisson est recommandée pour la santé. En effet, le poisson apporte des acides gras oméga-3 dont on connaît les effets bénéfiques sur le fonctionnement du cœur et du cerveau. Le poisson issu de l'aquaculture est riche en acides gras omega-3 car son alimentation comporte de la farine et de l'huile de poisson, produits très riches en acides gras omega-3. Afin de préserver les ressources marines, la tendance actuelle est au remplacement de la farine et de l'huile de poisson par des végétaux. Cependant, cette substitution non seulement diminue la quantité d'acides gras omega-3 dans la chair du poisson mais aussi réduit les performances de croissance des poissons. Cette croissance plus faible serait due à une diminution de la prise alimentaire des poissons. En raison du rôle des acides gras omega-3 sur le fonctionnement du cerveau, cette baisse de l'ingestion pourrait être une conséquence de la suppression des farines et des huiles de poissons et donc des acides gras omega-3 dans les aliments des poissons. L'objectif de cette expérimentation est donc d'évaluer si la présence d'acides gras omega-3 dans les aliments influence ou non la prise alimentaire du poisson et si oui, de caractériser les mécanismes mis en jeu par les acides gras omega-3 dans le cerveau pour réguler la prise alimentaire. Pour cela, une

expérience de choix préférentiel va être réalisée sur des truites arc-en-ciel mâles et femelles de 40 grammes. A l'aide d'un système d'alimentation à la demande appelé « self-feeder », les animaux vont se voir proposer un choix de trois aliments durant 6 semaines par groupes de 20 truites par bassin : un aliment pauvre (appelé Low oméga-3 ; LW3) en DHA/EPA (0,2% des acides gras totaux), un aliment médium (appelé control oméga-3 ; CW3) en DHA/EPA (5,5% des acides gras totaux) et un aliment riche (appelé High oméga-3 ; HW3) en DHA/EPA (20% des acides gras totaux). Dans le but de favoriser le bien-être et de minimiser au maximum le stress de l'animal, les conditions suivantes sont optimisées : la température est à 17°C (+/- 1°C), la lumière est réglée en photopériode sur un cycle jour/nuit de 24h (avec une période progressive d'aube et de crépuscule durant 30 minutes), l'eau est saturée en oxygène à 8mg/L, les bacs sont constamment renouvelés en eau propre (3 litres/minute) et la densité d'animaux par bac est de 8kg/m³ (20 animaux de 40 grammes dans 100 litres d'eau) loin du maximum physiologique accepté 40kg/m³. Il a été démontré précédemment que l'ensemble de ces dispositions expérimentales ne stresse pas les animaux permettant ainsi le bon déroulement d'une expérimentation de choix préférentiel. Aussi, toujours dans le but d'optimiser le bien-être et de permettre la bonne conduite de l'expérience (liée à aucune perturbation extérieure autre qu'alimentaire), les animaux se verront proposer 2 choix alimentaires par bac : CW3-LW3 ou HW3-LW3 ou CW3-HW3. L'expérience sur les 3 groupes (20 animaux X3) se fera en quadruplicata pour s'assurer des résultats obtenus. Là aussi, il a été démontré que le quadruplicata est un prérequis pour pouvoir confirmer les résultats des expériences en self-feeder. Ainsi nous aurons 12 bacs de 20 animaux chacun (240 totaux) répartis de cette façon (avec inversement de l'emplacement du distributeur à 20 jours) : 2 bacs (CW3-LW3) + 2 bacs (LW3- CW3) ; 2 bacs (CW3-HW3) + 2 bacs (HW3- CW3) ; 2 bacs (LW3-HW3) + 2 bacs (HW3-LW3). Ainsi sur les 4 bacs de quadruplicata, deux présentent une disposition identique (vrai duplicata), les deux autres une disposition inversée par rapport au deux premiers (vrai duplicata également), et au bout de 21 jours la place des self-feeders au sein d'un même bac (quadruplicata finaux).

Les animaux seront pesés au début et à la fin de l'expérience dans le but d'éviter des périodes de stress en mesurant leur poids quotidiennement. A la fin de l'expérience, les animaux seront pesés puis euthanasiés et leurs cerveaux seront récupérés dans le but de réaliser des analyses biochimiques en mesurant le taux d'incorporation des lipides ainsi que des analyses moléculaires au niveau des gènes de différentes zones cérébrales ce qui permettra de faire le lien avec les analyses de préférences alimentaires des truites arc-en-ciel observées en self-feeder.

Dans le cadre de la règle des 3 R, soulignons que :

- Le remplacement n'a pas été possible, car les études et les effets observés de la préférence alimentaire d'un animal ne peuvent pas se faire in vitro ou par des systèmes de mesures informatiques.
- Le raffinement a été respecté car aucun prélèvement ne se fera sur animaux vivants, de plus nous avons optimisé au mieux les conditions d'élevage pendant l'expérience comme mentionné (température contrôlée, photopériode avec aube et crépuscule, lumière tamisée, densité des animaux faible...).
- La réduction a été un objectif réel, le nombre de poissons prélevés (euthanasie par bain anesthésiant de benzocaïne puis bain euthanasiant) est calculé ad minima, compte tenu de la variabilité individuelle observée dans des analyses antérieures.

12390 Dans le cadre de développement de nouveaux candidats médicaments, une modification de la formulation, de la voie d'administration ou un ajustement de la dose thérapeutique peut amener à étudier les effets sur l'état général de l'animal ou les effets uniquement en local vis à vis du composé dans ces nouvelles conditions.

Le projet consiste donc à évaluer sur un très petit groupe d'animaux ces effets avant de continuer sur une étude avec un nombre plus grand d'animaux. Après administration du composé, une observation régulière des animaux sera réalisée grâce à un outil de surveillance spécifique à chaque espèce utilisée. Des prélèvements de sang ou de tissus pourront être effectués au cours de cette étude.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 780 animaux (300 rats, 300 souris et 180 cobayes) sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur l'organisme. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le rat, la souris et le cobaye sont les espèces qui sont les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

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

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est obtenu par un suivi accru des animaux avec l'utilisation d'un outil permettant d'évaluer l'état physique de l'animal dès l'apparition d'effets non désirés. Cet outil permettra de suivre l'évolution du poids de l'animal, de son aspect physique (fourrure, yeux), son activité générale et ses mouvements, sa respiration, son comportement face à l'expérimentateur ou ses congénères. Cet outil permettra de prendre les décisions éthiques adaptées pour l'animal dès l'apparition d'éventuels effets indésirables (points limites).

12391 Les rhumatismes inflammatoires correspondent à une inflammation articulaire dans le cadre de maladies générales de l'organisme avec un risque de handicap et une baisse de la qualité de vie. Les mécanismes aboutissant aux rhumatismes inflammatoires restent mal connus.

Le but de notre recherche est d'étudier si des modifications au niveau du tube digestif peuvent interférer avec le développement de l'arthrite. En cas de résultats positifs, ce projet permettra une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de l'arthrite et contribuera à ouvrir la voie vers de nouvelles approches thérapeutiques.

L'exploration du lien entre le tube digestif et l'arthrite inflammatoire doit tenir compte des interactions complexes entre le contenu du tube digestif et les nombreuses structures mécaniques, chimiques et immunologiques présentes dans l'intestin. L'étude de la physiologie gastro-intestinale ne peut être réalisée que sur des animaux puisqu'à ce jour aucun système cellulaire in vitro ne permet de reproduire ces interactions complexes.

Nous avons choisi d'utiliser des modèles murins pour des raisons de faisabilité. En effet, les modèles d'arthrite expérimentale sont largement documentés dans la littérature, y compris des modèles de souris transgéniques qui développent spontanément le phénotype recherché à l'âge adulte.

Ce projet durera 5 ans et utilisera au maximum 676 souris. L'estimation de ce nombre repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type tout en respectant la règle des 3R. Ainsi, le nombre de souris sera réduit au strict minimum pour obtenir des résultats pertinents statistiquement. Le nombre de souris à utiliser a été calculé à l'aide d'un outil bio-statistique dans le but d'estimer le nombre minimum suffisant pour obtenir des résultats significatifs. Ce nombre tient compte du nombre nécessaire de contrôles. Il tient également compte de la nécessité de reproduire les résultats, afin de pouvoir identifier et exclure d'éventuels artéfacts expérimentaux et ainsi éviter des erreurs d'interprétation.

Au cours de l'expérimentation, les souris seront observées régulièrement pour détecter d'éventuels signes de douleur, de souffrance ou de stress. 64 souris seront utilisées dans une procédure de sévérité légère et 612 souris dans 4 procédures de sévérité modérée. Nous utiliserons une grille d'évaluation clinique pour intervenir dès que les points limites définis sont atteints (pour faciliter l'accès à la nourriture dans la cage à l'aide du gel humidifié, augmenter la fréquence de surveillance voire euthanasier les souris).

12392 La recherche de nouveaux traitements anticancéreux plus efficaces agissant de manière ciblée sur les tissus cancéreux et pouvant inclure une fonction diagnostique représente un défi majeur en oncologie. Les approches les plus poussées développent des nanovecteurs dits « intelligents » car ils réagissent aux spécificités des tumeurs, permettant la visualisation de processus physiopathologiques et la mise en place de traitements ciblés.

C'est dans ce champ de recherche que s'inscrit notre projet. Nous proposons la conception de nanoparticules détectées par imagerie IRM couplées à des molécules qui sont de puissants agents inhibiteurs de l'héparanase, enzyme surexprimée dans la plupart des tumeurs et qui contribue à la prolifération tumorale par activation de la formation des vaisseaux sanguins. Ces outils intègrent donc 1/ une fonction de ciblage des tumeurs, 2/ une fonction diagnostique par imagerie IRM, et 3/ une fonction thérapeutique par l'inhibition de l'enzyme ciblée.

Dans un premier temps, nous avons préparé et purifié différents molécules et sélectionné celles qui sont actives sur cellules in vitro. Dans un second temps, nous avons préparé des nanovecteurs : nanoparticules d'oxyde de fer couplées aux molécules sélectionnées. Les premiers tests in vivo chez la souris ont montré que ces nanovecteurs permettent de visualiser le système vasculaire et ont un temps de vie dans la circulation sanguine relativement élevé ce qui suggère qu'ils seront adaptés pour visualiser les tumeurs. Ces résultats devront être confirmés dans ce projet.

Il s'avère maintenant essentiel de poursuivre les recherches sur des modèles in vivo de tumeurs chez la souris pour valider deux aspects. Le 1er est la propriété diagnostique des nanovecteurs en tant qu'agent de contraste IRM qui ne peut être vérifiée que par des tests d'imagerie sur petit animal. Le 2nd est l'accumulation des nanovecteurs dans la tumeur, conditions nécessaire avant d'envisager l'évaluation leurs effets thérapeutiques anti-tumoraux.

Le passage aux expérimentations in vivo est appuyé par plusieurs éléments forts garantissant le bien-être animal : 1) Des tests préliminaires chez la souris ont été effectués dans un laboratoire collaborateur à Madrid et n'ont révélé aucun problème de tolérance chez celle-ci ; 2) Les nanovecteurs de base et certaines des molécules utilisées qui ont reçu séparément l'autorisation de la US Food Drug and Administration (FDA) et sont déjà sur le marché ; 4) Les 2 modèles de tumeurs mammaires utilisés sont bien connus, soit par des données de la littérature, soit bien maîtrisés au laboratoire, 4) Les doses de nanovecteurs et le nombre d'animaux sont optimisés au minima pour pouvoir obtenir des résultats statistiquement valables.

Le projet se déroulera de la façon suivante :

- Une étude du temps de vie vasculaire des nanovecteurs où des souris saines seront injectées avec les différents nanovecteurs et seront soumises à une imagerie IRM
- Le développement de 2 modèles de tumeurs mammaires par injection de cellules tumorales dans la glande mammaire des souris.
- Etude de la vascularisation des tumeurs par une technique d'imagerie IRM
- Etude de l'accumulation des nanovecteurs injectés aux souris dans la tumeur par imagerie IRM

La règle des 3R sera respectée avec:

Remplacer : les études in vitro ont été poussées au maximum au préalable

Réduire : une seule dose de chaque nanovecteur sera utilisée ; le nombre de souris est minimum pour obtenir une réponse (5 souris par lot pour les souris saines, 10 souris par lot pour les souris avec tumeur) ; imagerie de la même souris à différents temps pour le suivi longitudinal de la vascularisation des tumeurs ; imagerie des mêmes animaux qui permettra de déterminer la biodistribution, sa cinétique et le temps de vie vasculaire ; étude qui sera commencée avec 2 nanovecteurs et poursuivie avec 4 autres seulement si les résultats sont optimaux .

Raffiner : le modèle tumoral 4T1 est bien maîtrisé par le laboratoire ; la mise en place du modèle MDA-MB231 sera basée sur les données connues de la littérature en utilisant des souris SCID qui seront hébergées en portoir ventilé avec boisson, nourriture et litière stérilisées afin d'éviter toute infection ; les expériences seront réalisées sur des tumeurs petites (<1 cm³) pour limiter la gêne dans la locomotion qui pourrait être générée par une grosse tumeur et garantir le bien-être des

animaux ; toute éventuelle souffrance/douleur chez les animaux sera anticipée par la définition d'un pont limite qui, s'il est atteint, conduira à l'euthanasie immédiat de l'animal.

Dans les conditions définies pour ce projet (tumeurs <1 cm³), il ne devrait pas être observé de souffrance des animaux. Le projet prévoit l'utilisation de 145 souris maximum selon l'ajustement dépendant des résultats obtenus.

12393 Une des principales causes de développement tumoral est la non reconnaissance ou la reconnaissance tardive des cellules cancéreuses par le système immunitaire. Nous proposons donc d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la tolérance par le système immunitaire de ces cellules cancéreuses dans un modèle entier et vivant qui est la souris. Ce projet durera deux ans. A l'issue de ce dernier nous espérons mieux connaître les mécanismes cellulaires et avoir identifié des molécules anticancéreuses prometteuses.

Pour répondre à cette problématique, notre projet se divisera en plusieurs parties.

Nous étudierons d'une part le fonctionnement du système immunitaire lors de la reconnaissance des cellules du soi et du non soi. Pour cela des souris génétiquement modifiées (phénotype non dommageable) ou non seront injectées, par voie intraveineuse, avec des lymphocytes T marquées dont nous étudierons la prolifération. La prolifération, mesurée ex vivo après euthanasie de souris (2 à 7 jours après l'injection) étant témoin de la reconnaissance des cellules par le système immunitaire. Aucune anesthésie ne sera nécessaire. Cette étude nécessitera 270 souris.

D'autre part nous étudierons la reconnaissance de cellules tumorales, donc du non soi, par le système immunitaire. Nous testerons deux types de lignées tumorales qui seront injectées en sous cutanée aux souris transgéniques (phénotype non dommageable) ou non transgéniques. Puis nous injecterons, par voie intraveineuse à ces mêmes souris ayant reçues la lignée tumorale, des lymphocytes T marquées, dont nous étudierons ici encore la prolifération afin de voir si le système immunitaire est capable de reconnaître les cellules tumorales. Cette expérience ne nécessitant pas non plus d'anesthésie durera maximum 6 mois et utilisera 400 souris.

Enfin nous testerons différentes drogues anti tumorales.

Pour cela, nous implanterons d'une part, des tumeurs solides à des souris immunodéficientes. Les tumeurs seront implantées par procédure chirurgicale après une anesthésie générale de la souris. Après la chirurgie les animaux seront suivis quotidiennement durant 5 jours. Par la suite, la drogue à tester sera injectée par voie intrapéritonéale (ne nécessite pas d'anesthésie), une quinzaine de jours après l'implantation tumorale.

D'autre part, nous testerons des lignées tumorales injectées par voie intraveineuse ne nécessitant pas d'anesthésie et les drogues seront également injectées par voie intrapéritonéale. 360 souris seront utilisées et la procédure s'étalera au maximum 6 mois.

Dans le cadre de la règle des 3R (Réduire, Remplacer, Raffiner), nous avons commencé par des études sur des lignées cellulaires permettant une première validation des acteurs moléculaires ; les études sur modèle entier sont une étape finale et incontournable de validation. Cela nous permettra d'étudier dans un contexte d'organisme entier la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire. Le projet nécessitera 1030 souris au cours des deux ans et tous les animaux seront euthanasiés à la fin des procédures. Ce nombre a été défini afin d'utiliser le minimum de souris par groupe tout en assurant l'obtention de résultats statistiquement significatifs. De plus, la souris présente l'avantage d'être un petit mammifère dont la génétique est bien connue ce qui nous a permis de créer un modèle transgénique. Et la connaissance de son comportement permet l'évaluation de son bien-être et nous permet une meilleure prise en charge de la douleur (liée aux procédures) avec une mise en place de points limites qui conduiront à l'euthanasie anticipée des souris en cas d'atteinte.

12394 Les ovins sont une espèce dont la reproduction est saisonnière. Lors de la saison de repos sexuel, les ovaires des femelles sont au repos et il n'y a pas de cycles ovariens. Il existe néanmoins des moyens d'induire l'ovulation lors de cette période d'anoestrus. Nous travaillons notamment sur « l'effet mâle » c'est-à-dire la capacité qu'à l'introduction d'un mâle sexuellement actif à induire la

réactivation de l'axe reproducteur, conduisant au final à l'ovulation lors de cette période de repos sexuel. Les ovins sont une espèce d'intérêt agronomique et « l'effet mâle » peut représenter une alternative à l'utilisation des traitements hormonaux utilisés plus classiquement en élevage pour induire l'ovulation en saison de repos sexuel. L'induction d'une ovulation lors de la saison de repos sexuel permet aux éleveurs de produire du lait tout au long de l'année, c'est donc une pratique très répandue en élevage ovin.

Dans ce cadre, il a été montré que l'odeur du mâle est un stimulus très important pour induire cette réactivation. Notre projet s'intéresse donc aux régulations olfactives impliquées dans ce mécanisme. Dans ce cadre, nous nous intéressons ici à la manière dont l'ensemble des protéines sécrétées au sein de l'épithélium olfactif peut être influencé par l'introduction du mâle. Ces variations sont d'intérêt car les molécules olfactives volatiles sont en général des molécules de faible poids moléculaires qui se lient à des transporteurs protéiques afin d'arriver au niveau des récepteurs olfactifs. Ces transporteurs permettent le transport des molécules olfactives au sein d'un environnement aqueux et leur disponibilité (ou variation en fonction des situations) peut donc tout à fait être une étape limitante ou cruciale dans la régulation olfactive de l'effet mâle. Ainsi, nous souhaitons ici étudier chez des brebis en anoestrus, l'expression des transporteurs des molécules olfactives chez les ovins en comparant un groupe de femelles isolées ou en interaction avec un mâle et ce à différents temps suivant l'introduction du mâle. A cette fin, nous utiliserons 2 groupes de 6 femelles chacun (soit n=12 en tout) et 2 mâles.

Ce projet respecte la règle des 3R:

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

Raffinement: Les animaux seront hébergés en groupes sur paille. Aucune incidence de l'expérience n'est attendue sur l'état général des animaux. En cas de problème, nous prendrons en compte les signes suivants: perte de poids, prostration, repli social... Dans tous les cas, la décision sera prise après examen vétérinaire et si les traitements appliqués éventuellement s'avèrent inefficaces.

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés (2 groupes de 6 femelles) a été limité au minimum tout en permettant une analyse statistique fiable et sur la base de notre expérimentation préalable chez les caprins.

12395 De nombreuses maladies neurologiques telles que la maladie de Parkinson, la fibromyalgie ou le syndrome des jambes sans repos sont associées à des perturbations de la transmission dopaminergique. Certains symptômes résulteraient en partie d'un dysfonctionnement des circuits neuronaux contrôlés par la dopamine au niveau de la moelle épinière.

L'objectif de cette étude est de caractériser l'identité des réseaux neuronaux de la moelle épinière activés suite à la stimulation de la transmission dopaminergique. La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de souris sauvages ainsi que de différentes lignées de souris transgéniques permettant 1) l'identification cellulaire et moléculaire des populations neuronales activées dans la moelle épinière en réponse à la stimulation de la transmission dopaminergique et de 2) déterminer leur rôle fonctionnel de ces réseaux dans le contrôle des fonctions motrices et sensorielles.

La règle des 3R sera appliquée de la façon suivante.

Réduire:

Cette étude anatomo-fonctionnelle s'articulera autour de 2 objectifs qui impliqueront 4 procédures expérimentales (classes légères à modérées).

Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude est de 448 sur une période de 4 ans. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité statistique des expériences qui seront menées. Seules les expériences considérées comme absolument indispensables seront réalisées. Dans le but d'une exploitation maximale des données obtenues, outre les moelles épinières tous les cerveaux des animaux utilisés seront prélevés après perfusion.

Raffiner:

Toutes les souris seront utilisées de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales. Les animaux seront hébergés en groupe dans des environnements enrichis (nids végétaux...). Afin de diminuer le stress, les souris seront manipulées quotidiennement par les expérimentateurs avant chaque procédure expérimentale. Ce projet implique de la neurochirurgie qui sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance sont détectés.

Remplacer:

Le projet reposant sur l'établissement de liens de causalité entre l'identité cellulaires des réseaux neuronaux activés dans la moelle épinière par la dopamine et le contrôle des fonctions sensorimotrices, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par des méthodes alternatives.

12396 Des analyses du cancer du sein ont montré que l'expression du peptide LL-37 dans les tumeurs est associée à la progression tumorale et au processus métastatique. Nos études nous ont permis de caractériser les activités du peptide qui provoquent le processus métastatique. Nous avons découvert que deux versions tronquées du peptide naturel peuvent bloquer ces activités. Ces nouveaux peptides pourraient donc être utilisés pour le traitement anticancéreux.

Pour cela, nous avons besoin d'utiliser des systèmes dans lesquels l'ensemble des paramètres (ex: présence de vaisseaux sanguins, apport de métabolites sanguins vers la tumeur) qui sont modifiés lors du développement du cancer sont présents. Ces systèmes doivent également refléter la complexité du modèle humain. Cela nécessite l'utilisation d'un modèle de souris qui développe l'ensemble des propriétés observées dans le cas du cancer du sein chez la femme.

Ce projet nous donnera aussi l'occasion de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement du cancer. 164 souris seront utilisées dans ce projet. Ce nombre représente le nombre minimum d'animaux requis pour observer des différences significatives entre les différents groupes expérimentaux.

La stratégie expérimentale du projet respecte la règle « 3R : remplacement, réduction, raffinement » :

Remplacement: Il est important de noter qu'il n'y a pas de modèle in vitro capable de modéliser ce type de cancer. Nous avons suivi la règle de réduction du nombre d'animaux (un nombre plus petit d'animaux compromettrait fortement la validité statistique des résultats).

Raffinement: le développement des tumeurs sera limité et les animaux portant des tumeurs seront particulièrement suivis afin d'éviter toute souffrance. Les souris seront placées sous anesthésie générale pour limiter la douleur lorsque la procédure subie le nécessitera. Les animaux seront hébergés dans des cages dont l'environnement sera enrichi (5 animaux par cage stérile, avec tunnel, igloo). Les souris seront suivies deux fois par semaine afin de vérifier leur état de santé et leur bien-être (points limites).

12397 Le diabète de type 2 (associé à l'obésité) et l'ostéoporose sont des maladies avec une prévalence croissante et un impact élevé sur la morbidité et la mortalité. Les femmes obèses ont toujours été considérées comme protégées contre l'ostéoporose et les fractures associées à la ménopause. Cependant, plusieurs études récentes ont contesté l'idée répandue que l'obésité protège contre la fracture et ont suggéré que l'obésité est un facteur accru de risque pour certaines fractures (chez l'homme comme chez la femme). Comprendre comment l'organisme régule le métabolisme osseux et le poids corporel est donc important pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Notre étude s'inscrit donc dans cette perspective d'étudier l'effet d'hormones gastro-intestinales, les incrétines (dont certaines sont déjà proposées dans le traitement du diabète de type 2) sur le contrôle nerveux du métabolisme osseux et du poids corporel. Le tissu osseux est un tissu vivant minéralisé très complexe remodelé en permanence, en masse et en architecture, pour s'adapter à la croissance, au vieillissement et aux contraintes mécaniques. Le remodelage osseux est assuré

par un mécanisme complexe où interviennent à la fois des mécanismes hormonaux (hormone parathyroïdienne, calcitonine, œstrogènes, etc.), des signaux locaux provenant du microenvironnement osseux, des signaux éloignés provenant de l'hypothalamus (une région du cerveau) et des facteurs biomécaniques. Une altération de la réponse à ces signaux conduit au développement de maladies osseuses fragilisantes telle que l'ostéoporose en réduisant la résistance mécanique et en entraînant un risque accru de fracture. De plus, des similitudes avec le métabolisme énergétique ont pu être mises en évidence, où une coopération entre différents tissus (pancréas, intestin, tissu adipeux, cerveau, ...) est requise. Une régulation centrale des métabolismes osseux et énergétique par le système gastro-intestinal est suspectée. En effet les récepteurs à certaines hormones intestinales sont exprimés dans des localisations cérébrales connues pour contrôler ces deux métabolismes. Notre hypothèse est que l'administration centrale de ces molécules serait capable de modifier le métabolisme osseux et le métabolisme énergétique dans une situation physiologique et dans une situation d'obésité. Les buts de ce projet de recherche sont valider *in vivo* notre hypothèse de travail. Les résultats escomptés sont d'améliorer notre connaissance sur le mode d'action des hormones intestinales et ainsi d'identifier de nouvelles pistes pour un traitement des affections des métabolismes osseux et énergétiques. Afin de mener à bien ce projet, nous avons pris en compte la règle des 3R : Remplacer, Réduire, Raffiner. Ce type de projet ne peut se faire que par l'utilisation de modèles animaux et ne peut pas être remplacé par des études *in vitro* ou *in silico*. Un total de 512 animaux est requis pour conduire à bien ce projet. Ce nombre d'animaux constitue le plus petit nombre d'animaux permettant d'aboutir à des résultats significativement exploitables scientifiquement. Nous avons de plus pris soin de raffiner les conditions d'hébergement par ajout d'un nid végétal, et nous avons veillé à l'induction correcte de l'anesthésie (et de l'antalgie) des animaux pendant les procédures expérimentales qui le requièrent. De la pommade ophtalmique est placée sur les yeux des souris pour éviter la dessiccation pendant l'anesthésie, et au réveil des croquettes sont placées à même la litière pour éviter des tensions au niveau des sutures.

12398 Les caprins sont une espèce saisonnière qui connaît une alternance entre une saison sexuelle où les femelles présentent des cycles ovariens ponctués par des ovulations et une saison de repos sexuel où l'ovaire est au repos. Ainsi, lors de la saison de repos sexuel, il n'est pas possible de mettre "naturellement" les animaux à la reproduction, ce qui pose des problèmes importants dans les systèmes de production animale. Pour contourner ce problème, les filières d'élevage utilisent des traitements hormonaux exogènes. Cependant ceux-ci ne vont pas sans entraîner un certain nombre de problèmes sanitaires, environnementaux et d'acceptation sociale. Néanmoins, il existe une possibilité d'induire l'ovulation en saison de repos sexuel en utilisant les interactions sociales, c'est "l'effet mâle." Ainsi, l'introduction d'un mâle au sein d'un groupe de femelles en repos ovulatoire peut déclencher cette ovulation. De manière intéressante, il a été montré que les stimulations olfactives provenant du mâle sont les plus efficaces pour induire cette ovulation. Dans un contexte de développement plus durable des productions animales, nous avons identifié un certain nombre de molécules produites par le bouc en saison sexuelle et qui pourraient induire l'ovulation. Nous voulons donc tester l'efficacité de ces molécules olfactives en mesurant la réponse ovulatoire suite à leur présentation et via la mesure de la libération de différentes hormones dans le sang. Ce programme s'étalera sur 5 ans où nous serons amenés à tester 15 groupes de 8 animaux, soit un total de 120 chèvres.

Ce projet respecte la règle des 3R:

Remplacement: la complexité de la réponse physiologique étudiée ne peut pas être remplacée par des systèmes alternatifs

Réduction: le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé afin de ne pas utiliser plus d'animaux que nécessaire, tout en conservant une bonne mise en évidence statistique

Raffinement: Les animaux seront hébergés en groupe social sur paille et avec enrichissement (casse en bois pour grimper) et le nombre de prises de sang a été réduit par rapport au protocole habituel. Aucune incidence de l'expérience n'est attendue sur l'état général des animaux. En cas de problème, nous prendrons en compte les signes suivants: perte de poids, prostration, repli social...

12399 L'étude initiale repose sur l'utilisation par voie nasale de nanoparticules biodégradables et biocompatibles comme vecteur de protéines vaccinales dans le but d'immuniser contre une infection à *Toxoplasma gondii* et d'induire une réponse immunitaire systémique et muqueuse spécifique et protectrice dans un contexte de toxoplasmose aiguë, chronique et/ou congénitale. Les premiers résultats obtenus en toxoplasmose aiguë et chronique montrent que l'association extrait parasitaire et nanoparticules, dans un protocole de vaccination par voie nasale, induit une forte réponse immunitaire humorale et cellulaire associée à une réduction d'environ 70% de la charge parasitaire cérébrale et à une survie de 100% des animaux vaccinés. Résultats confirmés dans un modèle de toxoplasmose congénitale avec une réduction de 86% de la charge parasitaire associée à l'absence de signes cliniques dans la descendance des souris vaccinées. Ces résultats nous engagent, aujourd'hui, à optimiser la stratégie vaccinale en terme de voie et de nombre d'administration afin d'obtenir une protection stérilisante tout en respectant le confort des animaux vaccinés.

Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de maximum 432 souris femelles adultes de la lignée CBA/J, dont la sensibilité à la toxoplasmose est la plus proche de celle des espèces cibles du parasite dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Une approche *in vitro* a été développée en amont afin de valider notre hypothèse de travail mais cela ne reproduit pas un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie.

- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature et l'expérience des différents partenaires de ce projet.

- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Tout type de médication pouvant interférer avec la réponse immunitaire et/ou la multiplication du parasite est proscrit. Les souris sont suivies quotidiennement durant les 3 semaines qui suivent l'infection et pesées 2 à 3 fois par semaine (points limites).

12400 L'Hydrocéphalie est une maladie congénitale qui se caractérise par une accumulation anormale de liquide-céphalorachidien (L.C.R) provoquant la dilatation des cavités du cerveau. Cette maladie touche 1 nouveau-né sur 2000 et le seul traitement actuel des hydrocéphalies consiste à insérer un cathéter pour drainer l'excès de LCR vers une autre cavité naturelle où il peut se résorber. Cependant des complications mécaniques et surtout infectieuses sont possibles et des réinterventions sont nécessaires car le matériel devient inadapté avec la croissance de l'enfant.

A l'heure actuelle, il est connu que l'hydrocéphalie congénitale semble être la conséquence de mutations de gènes, dont le gène MPDZ, sans que l'on connaisse les mécanismes moléculaires associés à cette pathologie. Pour mieux les comprendre, l'étude chez l'animal est indispensable. Dans ce domaine la création de lignée de souris transgénique c'est-à-dire possédant la même mutation sur un gène MPDZ impliquée dans la pathologie chez l'homme est un outil indispensable pour faire avancer la recherche.

Ce projet vise à générer une nouvelle lignée de souris dont le gène MPDZ sera muté uniquement dans le cerveau. Des animaux seront mis en reproduction et maintenu sur 5 ans. La lignée de souris produite ne devrait pas présenter de phénotype dommageable. Néanmoins, si un phénotype dommageable est observé chez les animaux, le projet sera abandonné.

Règle des 3R. Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « *in-vitro* » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. Raffiner : Pour supprimer l'angoisse ou la détresse des animaux au cours de la procédure, les animaux sont élevés en cage collective enrichie. L'inspection du phénotype des nouveau-nés : poche de lait bien remplie, développement moteur normal, croissance normale est réalisé par le zootechnicien. Toute anomalie sera répertoriée dans un fichier via l'outil informatique de gestion des lignées par le zootechnicien qui en informe directement l'expérimentateur. Des critères d'arrêt de procédure suffisamment précoces ont été mis

en place pour anticiper toute douleur des animaux. Réduire : Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, pour la reproduction un minimum de couples seront utilisés pour produire la génération de souris désirée. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à la création d'une seule lignée de souris transgénique est de 129 souris plus 120 souris pour maintenir la lignée sur 5 ans.

12401 La maladie de Behçet est une maladie multisystémique caractérisée par une inflammation chronique des vaisseaux sanguins. Elle se manifeste essentiellement par une atteinte des muqueuses, telle des aphtes buccaux ou génitaux, auxquels s'associent de façon variable une atteinte des yeux, de la peau, des articulations, du système nerveux et plus rarement d'autres organes. Une fatigue très prononcée est également présente.

Il n'existe pas de traitement à l'heure actuelle qui guérisse définitivement cette maladie. Plusieurs médicaments sont cependant utilisés dans le but de supprimer la réaction inflammatoire, de traiter les principaux symptômes de la maladie et de limiter les complications et l'altération des organes atteints. En revanche, il existe un risque de rechute de la maladie à l'arrêt des traitements, qui explique la nécessité de poursuivre une surveillance en consultation au long cours.

Les causes de cette pathologie sont encore inconnues, et les hypothèses suggèrent une origine génétique combinée à des facteurs environnementaux. La mise au point de modèles animaux mimant cette pathologie est difficile, à cause en partie à l'origine multifactorielle encore peu connue de cette pathologie, mais également à cause des nombreuses dérégulations immunitaires complexes multisystémiques. Elle reste cependant indispensable pour la compréhension et l'évaluation de cette maladie complexe mais également pour l'évaluation de nouvelles molécules thérapeutiques.

La recherche d'un traitement efficace sur le long terme est un enjeu important dans le traitement de cette pathologie pouvant devenir handicapante dans la vie quotidienne (prise de médicament journalier, suivi médical, atteinte d'organes pouvant entraîner un handicap physique, ...).

Le modèle choisi est un modèle utilisant le rat et basé sur le caractère auto-immun de la maladie. C'est un modèle décrit dans la littérature comme étant l'un des plus pertinents pour l'étude de cette maladie et la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques.

Différentes études seront réalisées au cours de ce projet. 1200 animaux au total seront prévus dans ce projet, correspondant à 120 rats par étude, avec 15 groupes de 8 animaux et 10 études au cours des 5 années.

Afin de répondre à l'objectif de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable cette pathologie complexe pouvant toucher de nombreux organes différents et présentant de nombreuses interactions cellulaires et humorales.

Pour respecter les besoins physiologiques/comportementaux des animaux, les rats seront hébergés de manière collective, en maintenant des conditions environnementales adaptées à leur espèce (température, hygrométrie, éclairage, etc...).

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes permettant de détecter l'apparition de ces points limites et d'essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires (mises en place de traitement ou euthanasie des animaux) le plus rapidement possible.

L'objectif de ce projet est donc de mettre au point un modèle animal permettant ensuite l'évaluation de nouvelles molécules thérapeutiques ou prophylactiques luttant contre la maladie de Behçet.

12402 Le virus Zika (ZIKV) est un arbovirus transmis par les moustiques (*Aedes* spp) et appartenant à la famille des Flavivirus. Depuis 2007, le virus est considéré comme émergent suite à une large épidémie reportée sur l'île de Yap puis sur plusieurs îles du Pacifique, incluant la Polynésie française et la nouvelle Calédonie et plus récemment au Brésil, dans plusieurs pays d'Amérique centrale et du sud et des caraïbes où une importante épidémie de Zika sévit. Le virus Zika (ZIKV) est connu

pour provoquer de forte fièvre, d'athralgie conjonctivite mais il peut également être responsable de malformations neurologiques, de microcéphalies congénitales et du syndrome de Guillain-Barré chez l'adulte. La propagation du ZIKV aux Amériques et dans les tropiques renforce la nécessité de proposer des stratégies vaccinales et thérapeutiques pour contrôler l'infection. Le projet vise à tester sur un modèle murin (*Mus musculus*) immunodéprimé (C57BL/6J- *lfnar1*^{-/-} et *lfngr1*^{-/-}) ou non (B6.Cg-Tg(Hlx9-GFP)1Tmj/J), l'efficacité d'une stratégie vaccinale prime-boost (amorce-rappel) contre le virus Zika. Cette stratégie de vaccination a déjà été démontrée comme plus efficace que la stratégie de vaccination classique en une seule étape, notamment dans la vaccination contre le virus de la grippe. Afin d'étudier la réponse immunitaire induite par le vaccin et son efficacité, l'utilisation d'un modèle animal est malheureusement incontournable actuellement. Le protocole a été conçu de manière à réduire le nombre d'animaux au minimum requis pour l'analyse des résultats et dans le respect du bien-être des animaux notamment en déterminant des points limites de la douleur occasionné. Ainsi 4 différentes expériences seront conduites, utilisant 110 animaux au total afin de tester la toxicité et l'efficacité du vaccin.

12403 Des bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent se développer, entre autres, au niveau du tube digestif lors de traitements antibiotiques chez l'Homme.

L'apparition de ces résistances représente un problème de santé publique. Il est alors nécessaire de développer une alternative aux traitement antibiotiques existants afin de traiter une pathologie d'origine bactérienne chez l'Homme tout en limitant l'apparition de résistances aux niveau du tube digestif.

Le programme dans lequel est inclus ce projet propose de revoir la posologie (dose administrée, durée d'administration, mode d'administration) d'antibiotiques peu voire plus utilisés aujourd'hui et de quantifier l'apparition de résistances lors de l'administration de ces antibiotiques chez le porc.

Le projet en lui-même a pour objectif de déterminer la pharmacocinétique d'un de ces antibiotiques, la minocycline, au niveau de fractions intestinales chez le porc, un bon modèle pour l'Homme en ce qui concerne la flore digestive. Ces données sont nécessaires pour la mise au point du protocole qui nous permettra par la suite d'évaluer le niveau de résistances que l'on retrouve dans le tube digestif lors de l'administration de cet antibiotique.

Quinze porcelets seront utilisés pour ce projet. Aucune étude statistique n'est prévue, les porcs recevant tous par voie intraveineuse une administration unique de minocycline à une dose permettant de reproduire les concentrations plasmatiques retrouvées chez l'Homme. Ce nombre a été déterminé afin que trois porcs soient euthanasiés à chaque temps de prélèvements soit 1h, 4h, 7h, 24h et 48h après l'administration. Nous avons choisi d'euthanasier trois porcs à chaque temps en accord avec les résultats d'une autre étude menée au sein du même laboratoire pour un autre antibiotique.

Il n'est pas possible de se passer d'animaux pour ce projet car le devenir d'un médicament dans un organisme n'est pas prévisible par des études *in vitro* compte-tenu de la complexité des mécanismes mis en jeu (mécanismes d'absorption, métabolisme hépatique, diffusion tissulaire, élimination rénale). Cependant, les études d'efficacité de l'antibiotique à la dose préconisée pour limiter l'apparition de résistances au niveau du tube digestif pourront être menées *in vitro* afin d'éviter l'utilisation d'un plus grand nombre d'animaux ou d'animaux malades.

Les porcs seront hébergés en groupe avec des ballons et des balles à mâcher à disposition. Pour limiter leur stress, ils seront entraînés à la manipulation avant la réalisation du projet et du sirop de cassis leur sera donné comme "récompense" pour faciliter leur acceptation/apprentissage des manipulations. Ils seront sédatés avant administration de l'antibiotique et l'antibiotique sera administré via un cathéter placé dans une des veines de l'oreille. Une anesthésie plus profonde sera réalisée avant l'euthanasie des animaux.

12404 La grande alose et l'alose feinte ont vu leurs populations décliner ces dernières décennies à cause de l'implantation de barrages, de pollutions, de pertes d'habitats, et possiblement du changement climatique. Ces espèces sont classées VU par l'UICN en France, listées en Annexes II et V de la

DHFF et en Annexe III de la convention de Berne ; leurs œufs et leurs frayères sont protégés (arr. du 08/12/1988). Pour ces espèces, les jeunes stades (larves et juvéniles) sont soumis à de nombreuses pressions durant leur phase continentale, et le succès de leur dévalaison conditionne les effectifs des générations suivantes. L'objectif est ici d'acquies des connaissances sur l'écologie des jeunes stades des deux espèces pour évaluer les capacités de résilience et les possibilités de restauration de leurs populations dans le contexte actuel de changement global. Ces expérimentations seront conduites sur 5000 larves de grande alose provenant d'une structure d'élevage partenaire, et 5000 larves d'alse feinte obtenues après reproduction artificielle de géniteurs capturés dans le milieu naturel. Etant donné le manque de connaissances disponibles sur ces espèces, leur remplacement par un autre modèle biologique ne peut être envisagé. Par ailleurs, une réduction des effectifs proposés ici peut difficilement être envisagée pour mener à bien cette étude, car les taux de mortalité des jeunes stades peuvent avoisiner les 90% dans le milieu naturel. Les facteurs expliquant de tels taux de mortalité ne sont pas clairement identifiés, mais reflètent la grande fragilité de ces espèces aux premiers stades de développement. En conséquence, une grande attention est portée dans le cadre de ce projet sur le raffinement des structures d'élevage pour compenser la vulnérabilité de ces organismes. Un premier volet sera consacré à l'utilisation de l'habitat de ces organismes. Dans le milieu naturel, il est possible que les deux espèces occupent le même milieu avant leur dévalaison : il est donc pertinent de comparer leurs préférences au sein d'une même mosaïque d'habitats. Ces préférences seront décrites pour les deux espèces de manière indépendante, dans deux rivières artificielles : une première recevant un lot de 5000 larves de grande alose, une deuxième recevant 5000 larves d'alse feinte. Les déversements de ces lots auront lieu 10 jours après éclosion. Chaque rivière artificielle sera agrémentée de structures artificielles faisant varier la profondeur, la pente et la vitesse du courant, offrant ainsi plusieurs habitats aux larves. Le renouvellement des rivières se fera avec de l'eau de rivière naturelle et de l'eau de forage en continu ; l'alimentation sera assurée par des apports de zooplancton produit dans des bassins adjacents. Les comportements des aloses (répartition au sein des habitats, nombre de passages, comportement social, déplacements) seront observés sans manipulation directe durant leurs trois premiers mois de vie, via l'utilisation de caméras et également par des observations à l'œil. In fine, une description de leurs préférences d'habitat pourrait avoir une forte implication dans des pratiques de gestion de milieux et de restauration. Un second volet sera dédié à l'évaluation de leur sensibilité aux stress oxythermiques (i.e. stress lié à la température et à l'oxygène), de 10 à 90 jours post-éclosion. En effet, ces organismes peuvent être soumis à d'importantes variations de température (notamment des températures froides en début de vie) et à de faibles taux d'oxygène (hypoxie). Dans certains bassins versants de leurs aires de répartition, il est possible d'observer des épisodes de plusieurs jours où le taux de saturation en oxygène est inférieur à 30%, voire de plusieurs heures en-deçà de 20%. Si une étude antérieure a permis de décrire les comportements associés au stress hypoxique de juvéniles de ces deux espèces, aucune étude n'a permis à ce jour de déterminer leur gamme de tolérance à l'hypoxie avec précision, et en comparant diverses températures. Or de telles informations pourraient apporter des éléments explicatifs du succès de migration des aloses, et donc du recrutement des populations. Pour cette étude, des tests de sensibilité à l'hypoxie seront réalisés à trois températures (16, 22 et 28°C). La première session de test sera réalisée sur 96 individus de chaque espèce âgés de 10 à 15 jours qui n'auront pas été déversés dans les rivières artificielles ; les autres sessions de tests seront conduites à 30, 60 et 90 jours sur des effectifs similaires d'aloses échantillonnées dans les rivières artificielles grâce à un piège adapté. Chaque enceinte de test contiendra un unique individu ; la moitié des enceintes sera placée en conditions témoin (oxygène constant, 100%), l'autre moitié en hypoxie progressive par paliers. Les observations porteront sur l'apparition de comportements traduisant une insuffisance en oxygène et se poursuivront, dans chacune des enceintes, jusqu'à l'observation d'un ou plusieurs comportement(s) déjà définis comme points limites lors d'une étude antérieure, ou jusqu'à 30% de saturation en oxygène si ces comportements ne sont pas observés. La durée du test sera limitée à 3h20, avant une remontée rapide du taux d'oxygène à 100% pour évaluer le potentiel de récupération post-stress des aloses dans les 20h suivant le test. Tous les individus seront euthanasiés à l'issue des challenges afin de permettre des analyses biométriques a posteriori. Résumé des effectifs prévus pour chacune des deux espèces et pour l'ensemble des

manipulations : sur un effectif initial de 5000 larves, 96 seront dédiées à la première session de tests de sensibilité aux stress oxythermiques. Les autres larves seront déversées en rivières artificielles, et 288 d'entre elles seront ensuite recapturées pour les sessions suivantes de tests de sensibilité aux stress oxythermiques. A l'issue de l'ensemble des expérimentations, les individus survivants et n'ayant pas été manipulés seront transférés vers un aquarium partenaire.

12405 *Toxoplasma gondii* est un protozoaire largement réparti dans le monde. Le quart de la population mondiale est considéré comme infecté, avec des conséquences cliniques très variables. Jusqu'au début des années 2000, la toxoplasmose était considérée comme majoritairement asymptomatique et bénigne sauf dans le cas de la toxoplasmose congénitale et chez le sujet immunodéprimé. La transmission à l'homme se fait par consommation de viande infectée d'un grand nombre d'espèces homéothermes et la circulation du parasite dans l'environnement est assurée par des stades parasitaires présents dans les fèces de félidés sauvages ou domestiques. Les souches classées en type I, II et III sont dites « souches classiques » et circulent en Europe et en Amérique du Nord avec une prédominance du type II. Elles se caractérisent par une virulence définie par son effet sur les souris, le type I étant très virulent, le type II non virulent et le III de virulence intermédiaire. En Guyane, des souches classées comme atypiques car différentes génétiquement ont été isolées à partir d'humains et dans un contexte pathologique particulier. Ces souches, en relation avec un cycle sauvage de *T. gondii* dans la forêt amazonienne sont à l'origine de l'entité clinique appelée toxoplasmose amazonienne qui correspond à des formes cliniques sévères, multiviscérales, menaçant le pronostic vital chez des sujets immunocompétents, avec la notion chez les malades de contact avec les éléments de la forêt (eau, viandes, végétaux...). Si un certain nombre de souches animales a pu être isolé du milieu domestique, très peu ont pu l'être du milieu forestier.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet qui vise à isoler les souches de *Toxoplasma gondii* à partir de mammifères de Guyane. De ces isollements, pourra être i) identifié le réservoir animal de *T. gondii*, ii) réalisé le typage et la phylogénétique des souches circulantes en Guyane iii) envisagée une optimisation des outils diagnostics de toxoplasmose par la production d'Ag sous forme de tachyzoïtes avec mise en place du test de lyse et de la sérologie Modified Agglutination Test (MAT).

Ce projet comporte deux procédures sévères, durant chacune 31 jours.

1) Isolement des stades parasitaires de *T. gondii*. L'inoculation à la souris par voie intrapéritonéale de prélèvements de patients ou de lysats de tissus d'animaux permet l'isolement du parasite sous forme de tachyzoïtes lors de constitution et production d'ascite et dans les différents organes touchés et/ou sous forme de kystes sur cerveaux de souris

2) Entretien des souches sur souris et virulence estimée. L'inoculation à la souris d'une suspension de parasites permet la production d'ascite contenant des tachyzoïtes, stade parasitaire idéal pour la production d'antigènes pour la mise en place d'outils diagnostiques (sérologie, culture cellulaire...). De même, cette inoculation permet au bout de quelques semaines la production de la forme kystique.

Le recours à l'utilisation de souris pour l'obtention des deux stades parasitaires (tachyzoïtes et kystes) et l'entretien des souches reste aujourd'hui encore nécessaire. Elle permet à moindre mesure l'estimation du type de virulence de la souche. Pour le modèle *Toxoplasma*, il n'existe pas d'alternative commerciale notamment pour la production de forme kystique. Toutefois, l'entretien des souches pourra être réduit à 2 passages sur souris suivis de passages sur culture cellulaire puis d'une congélation des souches.

Les besoins maximaux, objet de la demande, sont estimés à 300 souris femelles adultes sur 2 ans pour l'étape isolement de *Toxoplasma* et 200 souris adultes pour l'entretien des souches sur la durée du projet. Ils pourront être moindres, selon le contexte sanitaire.

Nous limitons le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire pour l'isolement et l'entretien des souches, et planifions des procédures dont le raffinement méthodologique vise à respecter le bien-être des animaux et réduire tout stress ou souffrance éventuels. L'expérimentateur sera attentif à toute souffrance décelée chez les animaux et des points limites sont définis afin de mettre fin à cette souffrance le cas échéant.

12406 La majorité des maladies infectieuses émergentes dans le monde sont dues à des Arbovirus (Alphavirus et Flavivirus). Ainsi les virus du Chikungunya (CHIKV), du Zika (ZIKV) et de la Dengue (DENV), transmis par les moustiques, ont été depuis 10 ans et sont encore responsables d'épidémies majeures dans les DOM/TOM français et dans le monde. Ces virus sont responsables d'infection invalidantes chez l'homme, mais qui peuvent aller jusqu'à des neuropathologies graves avec des malformations congénitales (microcéphalie) du nouveau-né (ZikV) ou des décès (Dengue hémorragique). Ces arboviroses ont émergé comme des maladies infectieuses surtout avec le réchauffement climatique ; le développement de vaccins anti-Arbovirus est devenu une priorité en termes de santé publique. Pour ZIKV, cette priorité est très élevée pour protéger les femmes enceintes. Pour tous ces virus, elle se heurte à la nécessité de disposer d'un vaccin efficace mais sans risque, pour le nouveau-né ou en cas d'infection antérieure avec des Flavivirus d'autres sérotypes. Cela élimine les vaccins classiques basés sur des virus vivants atténués qui ont montré leurs limites avec les récents vaccins contre DENV. Nous proposons une nouvelle génération de vaccins sans virus ni adjuvant, qui est basé sur la présentation d'antigènes viraux par des nanovésicules naturelles, les exosomes. Notre programme propose de tester différents candidats vaccins exosomes contre CHIKV, ZIKV et DENV et de les comparer à des approches plus classiques à base de protéines de ces virus.

En ce qui concerne le Remplacement de la règle des 3R, nous pouvons affirmer que le remplacement des modèles animaux n'est pas possible ici et que l'étude des réponses immunitaires et des protections naturelles nécessitent encore l'utilisation de modèles animaux. La vaccination expérimentale chez la souris commune *Mus musculus*, s'impose comme un modèle expérimental pour tester l'immunogénicité et la protection donnée par des candidats vaccins contre les arboviroses. L'immunogénicité des candidats vaccins sera testée chez la souris adulte BALB/c. La lignée de souris BALB/c est une souris immunocompétente à la différence des souris AG129 souvent utilisées.

Conformément la Réduction de la règle des 3R, nous réduisons au maximum le nombre d'animaux utilisés avec des essais d'immunogénicité impliquant un effectif total de 72 souris. Afin d'utiliser le minimum de contrôles négatifs, nous effectuons en parallèle les tests de différents immunogènes de 3 virus différents. Ces animaux sont répartis afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs ; ainsi, nous utilisons des groupes de six (6) individus pour chaque condition de l'étude ; la bibliographie et nos études antérieures ont montré que cela permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs avec nos immunogènes à base d'exosomes. Les animaux seront immunisés par injection intradermique (ADN), intrapéritonéale (ADN) ou sous-cutanée (protéine pure ou sur exosomes).

Pour nous conformer au Raffinement de la méthode préconisée par la règle des 3R, nous avons mis en place des points limites pour d'éventuels signes d'inconfort, de stress ou de douleur pour garantir au mieux le bien-être des animaux. Les animaux seront hébergés en groupe en portoir ventilé avec enrichissement dans chaque cage.

12407 Le trouble du spectre de l'autisme est un trouble neurodéveloppemental sévère, dont les causes demeurent indéterminées. Il présente une incidence en constante progression, faisant de ce trouble un problème de santé publique de premier ordre. Notre connaissance de mécanisme biologique associée à l'autisme demeure limitée et la recherche n'a malheureusement toujours pas permis l'émergence de traitements réellement efficaces. Il est donc urgent de mieux comprendre ce trouble et de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

Les progrès techniques récents permettent d'envisager l'utilisation de la stimulation transcrânienne ultrasonore focalisée dans l'autisme et de tester son potentiel thérapeutique.

La neurostimulation ultrasonore est une nouvelle méthode de stimulation cérébrale qui permet de cibler une région particulière du cerveau.

L'objectif de ce projet sera donc d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette méthode dans 2 modèles du trouble du spectre de l'autisme chez la souris. Ces 2 modèles permettant de reproduire des symptômes autistiques chez la souris avec des causes différentes : une origine exogène pour

le modèle valproate molécule qui, lorsqu'elle est administrée lors de la grossesse, augmente le risque d'autisme chez la progéniture) et une origine génétique pour le modèle BTBR (lignée de souris présentant spontanément des déficits comportementaux similaires aux symptômes autistiques origine multigénique).

L'utilisation de ces 2 modèles est essentielle car elle permettra d'évaluer voir si les éventuels effets thérapeutiques sont généralisables quel que soit la cause. Enfin, nous chercherons à caractériser les altérations neurobiologiques communes aux modèles et associées aux effets de la neurostimulation ultrasonore.

Le projet comprend (1) une phase de développement de la technique de stimulation, (2) une phase de détermination des effets neurostimulateurs sur les réseaux neuronaux et de son innocuité et enfin (3) une phase de caractérisation des 2 modèles : leur profil symptomatique et le potentiel thérapeutique de la neurostimulation dans ces modèles.

La première phase nécessitera 10 souris.

La deuxième phase nécessitera 9 souris par groupe pour 8 groupes, donc un total de 72 souris.

La troisième phase nécessitera 16 souris par groupe pour 8 groupes pour chacun des 2 modèles, un total de 128 souris pour le modèle VPA et de 128 souris pour le modèle BTBR. En outre, les souris du modèle valproate seront obtenues à partir de l'injection de valproate ou placebo lors de la gestation. Il sera donc nécessaire d'obtenir initialement 80 femelles gestantes.

Ainsi, un nombre total de 418 souris maximum sera nécessaire pour la totalité du projet qui s'étendra sur une période de 3 ans. La règle des 3R est respectée

Raffinement : les modèles d'autisme chez la souris utilisés pour ce projet représentent des modèles environnementaux (valproate) et multigéniques (BTBR) validés. La neurostimulation ultrasonore est une technologie actuellement en développement dans notre laboratoire, nous possédons donc le matériel le plus récent et le plus adapté pour ce type d'intervention. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu. Aucun stress n'est appliqué. Les points limites sont bien définis.

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

Réduction : Les effectifs ont été calculés de manière précise afin de permettre une réduction des effectifs optimisée permettant de suivre les recommandations éthiques de maintenir une puissance statistique de 0.8 pour une taille d'effet estimée au plus proche des objectifs et des études précédentes avec le moins d'animaux.

12408 Le cerveau humain peut être exposé à des rayonnements ionisants dans un cadre médical, lors de leur utilisation en imagerie ou pour le traitement de tumeurs. Les rayonnements ionisants peuvent être, dans certaines conditions, à l'origine de différentes pathologies cérébrales telles que microcéphalies, troubles cognitifs, démences et cancers. Les conditions de survenue dépendent de très nombreux paramètres : la dose et le débit dose, la nature des rayonnements ionisants, le stade de développement du cerveau au moment de l'irradiation, le type de pathologie et différents facteurs génétiques encore peu identifiés. L'amélioration de la prise en charge des patients irradiés nécessite donc la mise en place de stratégies thérapeutiques et/ou préventives spécifiques qui passent par la caractérisation de ces différents paramètres et la mise au point de méthodes de diagnostic précoce de pathologies cérébrales radio-induites.

Dans cette optique, nous proposons de réaliser une série de tests comportementaux chez les souris afin de repérer de possibles altérations cognitives et/ou comportementales pouvant faire suite à une irradiation.

Les effets/doses d'une irradiation localisée du cerveau à différents âges chez la souris (de 10 jours après la naissance à l'âge adulte) seront testés à différentes doses de 100 mGy à 15 Gy qui correspondent à des doses utilisées dans un cadre médical lors de radiothérapies

Puisque différents types de rayonnement sont utilisés en radiothérapie chez l'homme, nous nous intéressons également à comparer les effets de trois types de rayonnements utilisés en

radiothérapie : irradiation gamma, irradiation X ou protonthérapie. Selon le type de rayonnement, les souris seront irradiées au sein de l'institut (irradiation gamma et X) ou en collaboration avec d'autres équipes de recherche (protonthérapie). Ces irradiations cérébrales seront réalisées sous anesthésie générale afin de limiter le stress des animaux lors des séances d'irradiation. L'ensemble des tests comportementaux sera réalisé au sein de notre laboratoire au sein d'une pièce spécifiquement équipée et dédiée aux études comportementales.

Le premier type d'analyse portera sur l'activité locomotrice des animaux et par l'analyse de différents items comportementaux : nettoyage du pelage, immobilisation, redressement sur les pattes arrières. Nous analyserons ensuite leur susceptibilité au stress grâce à un dispositif dédié (croix surélevée) permettant de déterminer le niveau d'anxiété des individus testés face à la peur du vide. Leur sociabilité sera ensuite étudiée à l'aide du test de Crawley, dans lequel l'individu test peut circuler librement entre un compartiment contenant un objet, un autre contenant un congénère et un dernier étant vide. En complément, nous étudieront la capacité des souris à se souvenir d'un événement et à préférer un événement nouveau dans un labyrinthe en Y. Enfin le niveau dépressif des souris sera évalué lors d'un test de nage forcée (test FST). Au total, notre étude permettra de mettre en évidence si les souris ayant été irradiées présentent un déficit mental et/ou une altération du comportement social en fonction du type et/ou de la dose d'irradiation.

Pour compléter l'aspect comportemental obtenu par ces tests, les analyses histologiques post-mortem seront réalisées afin de déterminer le substrat anatomopathologique des altérations cognitives et/ou comportementales radio-induites

Le modèle rongeur se justifie car il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. En effet, aujourd'hui il n'existe pas de méthodes alternatives pour étudier le comportement animal nous permettant de répondre à la question posée. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés dans des établissements reconnus. Un projet type permettant de comparer en duplicate 3 conditions d'irradiation ou de doses nécessitera un maximum de 150 souris au total. Ce nombre a été réduit au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences.

Au vue des collaborations déjà en cours avec différents laboratoires, nous estimons répéter ce projet type un maximum de trois fois par an soit un nombre total de 450 souris par an et 2250 pour 5 ans.

Le suivi quotidien des rongeurs, hébergés en groupe, garantira leur bien-être. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Leur état de santé sera surveillé tout au long de l'expérience, afin d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

12409 L'obésité apparaît comme un facteur de risque de nombreuses pathologies chroniques dont le cancer du sein, particulièrement en post-ménopause. Chez les sujets obèses, un état sub-inflammatoire associé à l'insulinorésistance favorise la formation de médiateurs pro-inflammatoires et de radicaux libres qui sont des facteurs de risque de la carcinogenèse ainsi que de l'émergence des récidives ou des métastases.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact de l'obésité associée ou non à l'activité physique sur le micro-environnement tumoral dans le cadre de la cancérogenèse mammaire. La complexité du micro-environnement tant du point de vue des interactions cellulaires que moléculaires ne pouvant être abordée in vitro, la mise en œuvre d'un modèle expérimental de tumeur mammaire syngénique chez la souris sauvage C57/BL6J (lignée EO771, issue de la même espèce de souris) devient nécessaire. Le projet sera conduit en 6 étapes successives afin d'étudier l'impact de l'obésité sur la croissance tumorale, puis sur la récurrence et l'apparition de métastases et enfin sur l'efficacité thérapeutique (radiothérapie, anticorps anti-EGF-R (Epithelial growth Factor Receptor : facteur de croissance épithéliale), modulateurs sélectifs du récepteur aux œstrogènes (SERM), inhibiteurs de l'aromatase (IA). Pour chaque étape, 40 femelles C57/BL6J de 28 semaines (4x10), dont 20 ovariectomisées afin de mimer les conditions de la ménopause, recevront pendant 8 semaines soit

un régime standard soit un régime high fat-high sucrose (HF-HS, régime riche en graisse et en sucre). Les animaux seront placés sous régime hypercalorique supplémenté ou non en principes actifs d'origine végétale doués de propriétés antinéoplasiques. Les cellules tumorales EO771 seront implantées par la technique de « fat-pad » pour l'étude de la carcinogenèse ou par injection dans la veine caudale pour l'étude de la récurrence. Les animaux recevront ou non un traitement anticancéreux en parallèle de l'implantation des cellules tumorales, soit par radiothérapie pour l'étude de la carcinogenèse, soit par hormonothérapie à base de tamoxifène (SERM) ou de létrozole (IA), ou par immunothérapie à base d'anticorps anti-HER2 (Human epithelial receptor 2 : facteur de croissance épithéliale) pour l'étude de la récurrence. Les animaux seront euthanasiés sous anesthésie générale après 2 à 3 semaines de croissance tumorale.

Le schéma de l'étude a été construit afin de limiter le nombre d'animaux utilisés et d'optimiser les groupes pour répondre à l'objectif. Ainsi les animaux seront répartis en groupes de 10 à 12 individus, permettant un échantillonnage statistique suffisant. La réalisation du projet nécessite l'emploi de 320 animaux pour couvrir toutes les étapes. Les durées des régimes, des traitements et de l'implantation des cellules tumorales sont issues de modèles publiés et de l'expérience des manipulateurs afin de garantir des temps d'expérimentation optimum pour le confort de l'animal. Les manipulations les plus génératrices de stress et de douleurs pour les animaux sont l'ovariectomie et la croissance tumorale, celle-ci étant limitée à 3 semaines pour ne pas dépasser un poids supérieur à 1% du poids corporel total comme vu dans de précédents modèles. Des points limites sont définis et contrôlés pour éviter toute souffrance potentielle des animaux.

Les avantages attendus de cette expérimentation sont la prise en compte du micro-environnement tumoral dans sa complexité avec les multiples acteurs cellulaires et moléculaires. Ce travail original doit contribuer à une meilleure compréhension des interactions entre l'obésité, l'exercice physique, la régulation du statut oxydant cellulaire et l'induction des signaux pro-inflammatoires responsables de l'inflammation chronique à bas bruit et de la cancérogenèse mammaire associée ou non aux traitements.

12410 Ce projet a pour objectif la mémoire sociale, un processus dépendant d'une région cérébrale particulière : l'hippocampe. L'incapacité à reconnaître sa famille et les personnes familières est un symptôme précoce de nombreuses pathologies psychiatriques. La région CA2 de l'hippocampe a été montrée récemment comme étant essentielle à la formation de la mémoire sociale. De plus cette région a aussi montré sa vulnérabilité dans de nombreuses pathologies psychiatriques et neurodégénératives. Afin de mieux comprendre les bases neurobiologiques du processus de formation de la mémoire sociale nous réaliserons une étude de traçage de circuits neuronaux impliqués. Les résultats obtenus permettront d'envisager, à terme, des traitements contre ces pathologies. Concernant la règle des 3R : Comme nous nous intéressons aux réseaux neuronaux impliqués dans les comportements, l'approche in vitro ne peut être utilisée comme tentative de remplacement. En ce qui concerne la réduction du nombre d'individus, les effectifs de souris envisagées seront limités à ce qui est nécessaire à la réalisation d'analyses fiables pour une publication des résultats, afin que la communauté scientifique puisse bénéficier des données obtenues et ainsi éviter une redondance avec des expérimentations ultérieures. Ainsi, 80 souris Swiss seront utilisées. Enfin, nous respecterons le raffinement par un suivi rigoureux du bien-être des animaux et des conditions d'hébergement par des personnes qualifiées et en mettant en place les soins adéquats pour réduire toute souffrance et/ou douleur (anesthésie, analgésie et points limites).

12411 Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacocinétique, de la toxicologie ou encore de l'efficacité. Ces

études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament et sont donc indispensables.

L'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde sont deux pathologies qui appartiennent à la famille des rhumatismes et entraînent des douleurs au niveau des articulations :

- L'arthrose ou ostéoarthrite (OA), est une affection chronique inflammatoire qui se manifeste par des douleurs persistantes aux articulations causées par l'usure anormale (dégénérescence) du cartilage et de l'ensemble de l'articulation.

- La polyarthrite rhumatoïde (RA) est également une maladie inflammatoire des articulations mais qui a une origine différente. En effet, elle est due à un dérèglement du système immunitaire (maladie auto-immune). Les articulations douloureuses gonflent puis se déforment menant dans 20% des cas à une incapacité fonctionnelle.

Ces deux pathologies affectent des millions de personnes chaque année. Elles ont donc des impacts sociaux et économiques majeurs sur les patients et le système de santé. Les thérapies actuellement disponibles pour traiter ces maladies ne réussissent pas à lever de façon adéquate la douleur chez beaucoup de patients, et les effets secondaires des traitements limitent considérablement leur utilisation. De plus, les traitements utilisés ne traitent que les conséquences de la maladie, c'est à dire l'inflammation et la douleur. Il y a donc un besoin urgent de trouver de nouvelles molécules efficaces. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet, le but étant d'étudier l'effet de nouveaux traitements potentiels sur la réponse à la douleur et l'inflammation dans des modèles animaux mimant l'OA ou la RA chez la souris ou le rat. Ce projet a déjà été déposé en 2015 mais il fait aujourd'hui l'objet d'un nouveau dépôt afin de rajouter des modèles animaux pertinents qui n'étaient pas présentés dans la première demande et d'inclure l'espèce souris.

Pour ce projet nous pensons effectuer 20 études avec pour chaque étude, l'utilisation de 65 animaux (6 groupes de 5-12 animaux), soit 1300 animaux sur 5 ans. Pour nos études, nous utiliserons potentiellement six modèles différents induits chez le rat ou la souris. Ces modèles animaux sont bien connus et employés intensivement dans la recherche sur l'arthrite et dans l'industrie pharmaceutique dans l'essai et la validation de nouveaux agents thérapeutiques potentiels.

En conclusion, ce projet permet d'envisager des bénéfices cliniques et économiques évidents. Pour des groupes de 5-12 animaux, réparti sur 5 ans, le projet porte sur une estimation de 260 animaux par an.

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

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

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

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

Toutes les procédures induisant une douleur chez l'animal seront réalisées sous anesthésie (chirurgie, injection intra-articulaire ou intra-dermique).

De plus, les animaux seront sous surveillance rapprochée. Les animaux seront suivis quotidiennement pour pouvoir identifier les signes de souffrance caractérisés par le comportement du rat : les changements physiques (pelage, peau, yeux...), la mobilité, l'alimentation, l'agressivité, le poids du corps (mesuré 2 fois par semaine) limité à une perte de 20% maximum par rapport au poids initial, la consistance des fèces. Si les signes persistent au bout de 24h, l'animal sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Notre projet se focalise sur un modèle expérimental nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Ces modèles in vivo permettent de mesurer la réponse à la douleur et l'inflammation en reproduisant la physiologie d'un organisme entier. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

12412 L'obésité et ses conséquences métaboliques représentent aujourd'hui l'une des cinq premières causes de mortalité dans les pays occidentaux. L'une des causes de développement de l'obésité est une perturbation du transport vers le cerveau des hormones qui induisent la satiété comme la leptine. Nous savons que pour atteindre le cerveau et lui commander de réduire notre prise alimentaire, la leptine doit traverser une barrière de cellules appelées tanocytes. Chez les sujets obèses, la leptine n'arrive plus à traverser cette barrière localisée dans l'éminence médiane de l'hypothalamus, une structure à la base du cerveau. La médecine ne peut pas agir sur ce problème car nous ne connaissons pas aujourd'hui les mécanismes qui permettent à la leptine de traverser cette barrière de tanocytes. Le but de ce projet est de pallier ce manque en étudiant les voies de transport qui permettent à la leptine de traverser les tanocytes. Pour cela nous devons identifier, dans les tanocytes, la nature et la localisation des différentes organelles subcellulaires spécialisées dans le transport vésiculaire. Ces travaux seront réalisés sur du tissu d'animaux prélevé post-mortem. Nous avons choisi d'utiliser la souris comme modèle animal car la structure de l'éminence médiane murine est bien caractérisée, les outils nécessaires à ce projet (notamment anticorps) ont été développés et caractérisés chez la souris et cela nous laissera l'opportunité d'utiliser des modèles de souris transgéniques. Nous estimons notre besoin maximal à 50 souris sur une période de 5 ans.

La parfaite connaissance des voies cellulaires qui contrôlent le transport des hormones métaboliques dans les tanocytes ouvrira des perspectives de recherche visant à réparer ce transport défectueux chez les patients obèses.

REMPACER : L'identification et la localisation des compartiments de transport dans les tanocytes doit se faire dans un environnement cellulaire le plus préservé possible. Nous n'obtiendrons pas du tout les résultats escomptés sur des tanocytes en culture primaire. En conséquence, il n'y a pas d'alternative aux coupes histologiques réalisées à partir d'éminence médiane.

REDUIRE : Pour chaque perfusion, le nombre maximal de coupes seront réalisées afin de n'utiliser qu'un lot de 2 animaux par expérience. Il est cependant impossible de diminuer à une souris par lot car cela réduirait trop le nombre de coupes réalisables.

RAFFINER : Les animaux sont hébergés en groupes sociaux dans des cages enrichies (matériel de nidation et bâton à ronger) permettant aux animaux d'exprimer le comportement inhérent à l'espèce. L'absence de souffrance est garantie par une anesthésie, analgésie profonde et des points limites définis.

12413 Le prurit urémique est défini comme une sensation de démangeaisons associée à l'insuffisance rénale chronique (IRC). De nombreux patients sous hémodialyse souffrent de prurit et d'une peau sèche et fissurée, ce qui réduit fortement leur qualité de vie. Les fissures de l'épiderme conduisent à l'exposition à l'air des terminaisons nerveuses superficielles, ce qui modifie leur sensibilité et leur conductivité. Au cours de l'IRC, l'urémie est augmentée ce qui favorise la réaction de carbamylation. En effet, cette réaction résulte de la fixation de cyanate, un produit de dissociation spontanée de l'urée, sur les protéines modifiant ainsi leur structure et leur fonction. Il a été démontré précédemment que les produits de carbamylation s'accumulent au cours du temps dans différents tissus dont la peau.

L'hypothèse sur laquelle repose ce travail est que la carbamylation des protéines et des acides aminés de l'épiderme peut favoriser la sécheresse cutanée et le prurit observés chez ces patients. Le but de ce projet est de déterminer si les protéines et les acides aminés de l'épiderme peuvent être carbamylés et, le cas échéant, leur rôle dans les manifestations cutanées décrites ci-dessus.

Pour cela, le protocole sera réalisé en deux étapes : une première permettant de valider l'hypothèse initiale et une seconde permettant d'évaluer l'effet (compétiteur) potentiel d'un traitement transcutané sous forme d'une crème riche en acides aminés dans des modèles de rats pour lesquels la réaction de carbamylation aura été amplifiée (soit par administration de cyanate dans l'eau de boisson, ou en induisant une IRC par néphrectomie subtotalée).

Ce projet a été conçu en accord avec les exigences de la règle des 3R, avec notamment :

- Remplacer : aucun modèle in vitro ne permet de reproduire la diffusion du cyanate à travers le derme et l'épiderme, ce qui est primordial pour vérifier l'hypothèse. De plus, les modèles in vitro d'épiderme ne présentent pas les terminaisons nerveuses ainsi que les différentes couches du stratum corneum qui jouent un rôle important dans le développement des signes cliniques étudiés. Il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal permettant de reproduire au plus proche les symptômes décrits. Enfin, l'effet de la crème ne peut être évalué que dans un modèle reproduisant au mieux les mécanismes physiopathologiques du phénomène observé.
- Réduire : Le nombre de rats à utiliser sur 3 ans est de 84. Il a été calculé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux tout en permettant une interprétation fiable des résultats basée sur des analyses statistiques adaptées.
- Raffiner : 2 à 3 rats seront hébergés par cage, avec de l'enrichissement, pour limiter le stress. Un suivi au quotidien sera réalisé afin de garantir leur bien-être et pour détecter les éventuels signes de douleur ou de stress surtout chez les rats ayant subi la néphrectomie. Des points-limites adaptés et précisément définis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance, auquel cas l'animal sera euthanasié. La chirurgie et le rasage seront réalisés sous anesthésie générale, les animaux reposant sur un matelas chauffant. Les animaux recevront un analgésique en sous cutané en post-opératoire afin de soulager la douleur.

12414 La schizophrénie est une psychose grave caractérisée par des signes de dissociation mentale, de discordance affective et d'activité délirante incohérente, entraînant généralement une rupture de contact avec le monde extérieur et parfois un repli autistique. Les symptômes de la schizophrénie se classent en deux catégories : les symptômes positifs et les symptômes négatifs. Les symptômes positifs sont les plus caractéristiques de la schizophrénie car ils incluent le délire, les hallucinations, les agitations et l'agressivité. Les symptômes négatifs (difficultés émotionnelles, manque de motivation, difficultés à agir) sont ceux qui contribuent le plus à l'isolement social. Les neuroleptiques restent encore aujourd'hui les médicaments de référence pour le traitement de la schizophrénie. Cette classe de médicaments a des effets secondaires importants (effet sur le système cardiovasculaire, apparition d'un syndrome de type parkinsonien). De surcroît, 10 à 20 % des schizophrènes restent totalement résistants aux médicaments disponibles.

Ainsi, l'étude de la physiopathologie et la découverte de nouvelles thérapeutiques efficaces sans effets secondaires majeurs restent les grands défis pour la recherche sur la schizophrénie.

Dans ce projet, nous nous intéresserons uniquement à deux caractéristiques de la schizophrénie l'hyperactivité et la réaction au test de sursaut acoustique. Dans ce but, nous induisons une hyperactivité ou une modification du comportement de sursaut par l'injection de phéncyclidine (PCP) ou de Dizocilpine (MK-801), des inhibiteurs des récepteurs au glutamate de type N-méthyl-D-Aspartate (NMDA) ou des psychotropes (Amphétamine). Cette induction couplée à l'administration de nouveau composé va nous permettre d'évaluer leur efficacité.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R,

Remplacement : au vu de la complexité de la pathologie et de ses symptômes aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. Cependant les molécules testées dans ce projet ont fait l'objet d'une sélection sur des tests in vitro afin de choisir celles qui ont le plus fort potentiel dans l'indication thérapeutique testée.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesures sont mises en œuvre notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement adaptées (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté, enrichissement du milieu : maisonnette pour les souris), une visite quotidienne et des points limites bien établis.

Réduire : nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 10 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 5 400 souris est envisagée.

12415 Chez l'Homme, les cancers de la tête et du cou, également appelé cancers oto-rhino-laryngologique (ORL) sont très fréquents et représentent la 6ème cause de cancer à travers le monde. Pour la moitié des patients, l'espérance de vie n'excède pas 5 ans, notamment en raison des échecs thérapeutiques et récidives. On distingue deux types majeurs de cancers ORL : les cancers liés à une infection virale antérieure et ceux provoqués par une exposition chronique de la muqueuse à des carcinogènes tels que le tabac ou l'alcool. Les cancers liés à une infection virale représentent aujourd'hui 35% des cancers ORL, mais sont en augmentation. Il est aujourd'hui admis que la diminution des défenses immunitaires contre les cellules tumorales au cours du développement du cancer représente une caractéristique majeure du cancer. L'objectif général du projet est de comprendre l'influence de l'environnement immédiat de la tumeur et en particulier des structures protéiques de cohésion cellulaire sur les fonctions des cellules du système immunitaire au cours du développement de ces cancers ORL.

Afin d'échapper au système immunitaire, les cellules tumorales mettent en place différents mécanismes dont la modification de son environnement immédiat qui passe d'un tissu normal à un tissu favorable au développement du cancer. La Matrice Extra Cellulaire (MEC) est un acteur clé de l'environnement immédiat de la tumeur qui participe activement aux interactions entre les cellules immunitaires et les cellules cancéreuses. Dans le cadre d'une collaboration nationale, nous avons identifié qu'une protéine structurant le tissu majoritairement représentée dans les cancers ORL et absente dans le tissu sain, impacte la distribution des cellules immunitaires dans les tumeurs. En effet, une étude préliminaire dans un modèle murin de cancer ORL chez des souris normales et d'autres n'exprimant pas cette protéine structurant le tissu a révélé que cette protéine est associée à la progression tumorale et séquestre les cellules immunitaires dans l'environnement immédiat de la tumeur. Il est important maintenant de comprendre les interactions entre les cellules immunitaires et cette protéine au cours du développement d'une tumeur et de déterminer si et comment cette protéine modifie la nature, la distribution et les fonctions des cellules immunitaires de l'environnement de la tumeur.

D'un point de vue expérimental, nous souhaitons mettre en place trois modèles murins de cancers épithéliaux de la cavité buccale afin de mimer la pathologie humaine chez la souris normale ou invalidée pour la protéine structurante que nous étudions. Un premier modèle, chimio-induit, consiste en l'application d'un agent chimique mutagène qui mime les effets de la nicotine lorsqu'administré dans l'eau de boisson des souris. Ce traitement mime les étapes du développement du cancer induit par le tabac chez l'humain indépendamment d'une infection virale oncogénique. Ce modèle murin permettra de comprendre les mécanismes immunitaires mis en jeu au cours du développement du cancer en présence ou l'absence de la protéine matricielle.

Nous utiliserons aussi deux modèles de greffe tumorale basés sur l'implantation dans la muqueuse buccale soit d'une lignée tumorale indépendante d'une infection virale ou soit d'une lignée tumorale dépendante d'une infection virale. Ces lignées seront implantées dans des souris invalidées pour notre protéine matricielle ou dans des souris contrôles. Ces deux modèles permettront de comparer les mécanismes immunitaires mis en jeu dans les cancers dépendant ou non d'une infection virale et seront utiles pour l'évaluation de stratégies thérapeutiques.

Ces différents modèles présentent des similitudes avec le cancer épithélial de la muqueuse buccale humaine et constituent des modèles appropriés et complémentaires pour la validation de cibles d'immunothérapie. De plus, les différents modèles seront développés dans des souris dans lequel de nombreux outils immunitaires sont disponibles et compatibles avec l'analyse des mécanismes immunitaires.

Au total, nous aurons besoin de 2100 souris pour répondre à nos questions biologiques sur 5 ans et obtenir des résultats statistiquement valides.

Le nombre d'animaux a été déterminé en tenant compte des exigences de remplacement, réduction et raffinement conformément à la réglementation éthique en vigueur :

Réduction : nous avons déterminé les effectifs de nos groupes de manière à obtenir une forte validité statistique avec un minimum d'individus et notre projet a été conçu pour optimiser la quantité d'informations analysables.

Remplacement : Il n'y a pas actuellement de méthodes alternatives in vitro permettant de mimer l'environnement épithélial tumoral.

Raffinement : Afin d'améliorer les conditions d'hébergement réglementaires des animaux (porteurs ventilés, 5 animaux par cage, objets déplacés régulièrement pour stimuler la curiosité) dans le contexte de cette pathologie buccale, du gel nutritif est ajouté dans la cage afin de faciliter l'alimentation après les injections des lignées tumorales. Les signes de l'évolution des lésions, le suivi des animaux seront effectués conformément à une grille d'évaluation permettant de définir un niveau de douleur/souffrance à partir duquel les animaux concernés seront euthanasiés. Plus particulièrement, il est à noter que le modèle tumoral sera établi de façon à limiter la croissance tumorale à un volume en deçà du point limite éthique afin d'éviter une souffrance liée à un problème nutritionnel et le suivi quotidien du comportement et une pesée bihebdomadaire des animaux permettra de détecter les signes précoces de souffrance.

12416 Les affections cardiaques sont aujourd'hui une des causes les plus fréquentes de décès et d'invalidité dans le monde occidental. Dans le souci de comprendre comment la régénération cardiaque pourrait être induite chez l'homme, nous avons choisi d'étudier ce phénomène chez le poisson-zèbre (*Danio Rerio*) dont le cœur peut régénérer. Nos précédentes études ont montré que, lors de la régénération cardiaque chez le poisson, les nouveaux cardiomyocytes sont produits grâce à la prolifération de cardiomyocytes différenciés préexistants.

De même, bien que les cardiomyocytes de mammifères adultes ne prolifèrent pas de façon naturelle, plusieurs équipes ont réussi à les faire se diviser en utilisant différentes techniques. En adoptant une stratégie expérimentale similaire à celle de notre approche chez le poisson-zèbre, il a été démontré que la souris néonatale possède aussi la capacité de régénérer son cœur via la dédifférenciation des cardiomyocytes, montrant que les mammifères ont le potentiel de régénérer leur cœur par des mécanismes similaires à ceux du poisson-zèbre. Nous souhaitons développer notre champ de recherche en incluant ce modèle souris néonatale de régénération cardiaque, ce qui nous permettra de traduire nos découvertes chez le poisson aux mammifères, et ensuite à l'Homme. Ce modèle consiste à créer une blessure cardiaque et d'observer au cours du temps la régénération.

Cette approche requiert l'utilisation d'un maximum de 1470 souris néonatales pour les 5 ans et s'inscrit en conformité de la règle des "3R".

Du point de vue du Remplacement, la majorité de notre recherche est conduite sur les poissons qui a permis de valider notre approche scientifique et maintenant il est temps de confirmer ces résultats chez les mammifères en utilisant la souris comme modèle.

Du point de vue de la Réduction, nous nous efforcerons d'effectuer la majorité de nos recherches en utilisant le système du modèle de régénération du cœur du poisson-zèbre. Nous ne ferons des expériences sur les souris néonatales qu'une fois que nous aurons des données concluantes de nos recherches sur le poisson-zèbre. Parce que nous validons les résultats du poisson-zèbre, nous n'avons pas besoin d'effectuer des expériences supplémentaires telles que tester des anticorps ou tester des inhibiteurs différents car ceux-ci auront déjà été déterminés. Nous utiliserons donc moins de souris que si nous faisons nos recherches uniquement sur ce modèle.

Du point de vue du Raffinement, nous adopterons toutes les mesures possibles permettant d'améliorer le bien-être des animaux. Nous offrirons des conditions d'hébergement selon les recommandations de la structure chargée du bien-être animal (cages avec enrichissement à l'aide de carrés de cellulose et de cabanes plastiques, accès non limité à l'eau et la nourriture, cycle jour/nuit, aération, humidité et température de l'air contrôlées...). Durant la chirurgie, les animaux seront anesthésiés à l'aide de méthodes adaptées aux nouveau-nés (hypothermie).

Les signes de douleur et de stress seront évalués à l'aide de grilles d'évaluation spécifiques et adaptées (nouveau-nés, adultes et maternage). Les animaux seront pris en charge en fonction de ces grilles d'évaluation (analgésie ou euthanasie). Nous surveillerons également le comportement des mères et les soins qu'elles apportent aux nouveau-nés lors de leur retour en cages.

Nous allons affiner nos techniques chirurgicales pour réduire la mortalité et l'invasivité en restant en contact avec le réseau de collaborateurs expérimentés sur cette technique pour rester au courant des améliorations apportées.

12417 La maladie de Parkinson correspond à une perte progressive des neurones dopaminergiques. Le déficit en dopamine au niveau cérébral induit de graves troubles moteurs chez le patient.

Les tremblements de repos constituent l'un des symptômes cardinaux de la maladie de Parkinson et peuvent être modélisés *in vivo* par l'induction de mouvements de tremblements de la mâchoire chez le rongeur par administration de substances pharmacologiques. Ainsi, l'administration de tacrine induit une perturbation de l'équilibre entre acétylcholine et dopamine dans le cerveau ce qui aboutit au phénotype comportemental. Les tremblements de la mâchoire (mâchonnement) induits peuvent être réversés par des agents pharmacologiques qui augmentent le tonus dopaminergique tels que les agonistes dopaminergiques (utilisés pour traiter la maladie de Parkinson).

L'objectif de ce projet est d'utiliser le modèle de tremblements induits par la tacrine comme modèle de screening pour l'identification de molécules anti Parkinson.

Pour ce projet, le nombre total d'animaux est estimé à 5250 rongeurs (3750 rats et 1500 souris).

Ce projet est conçu en accord avec le principe des 3Rs:

Remplacement : dans le cadre du développement de certains nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat et la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets anti parkinsoniens. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, le rat et la souris sont les espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures peu invasives réalisées sous anesthésie locale
- la surveillance renforcée des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- la surveillance continue de l'animal durant le test

12418 Ce projet a pour but d'évaluer les effets de différents candidats médicaments sur les paramètres cardio-vasculaires chez le primate non-humain vigile en utilisant la télémétrie. La télémétrie permet de mesurer différents paramètres physiologiques chez l'animal vigile non contraint.

Au cours de chaque étude, les primates, une fois instrumentés de manière chirurgicale, sont traités avec le candidat-médicament testé à différentes doses ou avec un véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée. Chaque animal reçoit tous les traitements ou une dose unique du traitement et un total de 84 animaux est prévu pour le projet.

Plusieurs administrations pourront être effectuées sur un même animal en respectant une durée minimale de 48 heures de récupération entre 2 administrations, ce qui permet de raffiner l'expérience.

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

Règle des 3 R: remplacement, réduction et raffinement

Remplacement : dans le cadre du développement de certains nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le primate car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets neurocomportementaux.

Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, le primate est une des espèces de non-rongeurs adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : un nombre minimal et homogène d'animaux est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. D'autre part, les animaux peuvent être utilisés à plusieurs reprises pour tester différentes doses du candidat-médicament ou différentes molécules.

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- la validation du système de télémétrie et validation pharmacologique du modèle
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire
- le suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux .

12419 L'inflammation est une réaction normale de défense du système immunitaire du corps à une agression externe. Elle peut poser problème lorsque cette réaction devient trop forte, et plus encore lorsqu'elle est chronique. Il faut alors diminuer la réponse inflammatoire par un médicament. Si les anti-inflammatoires classiques comme les corticoïdes ou les médicaments de la classe de l'aspirine suffisent dans certains cas, les maladies inflammatoires chroniques nécessitent souvent des traitements plus efficaces. De nouveaux médicaments sont utilisés depuis quelques années, dont le mode d'action est d'inhiber une cytokine produite par l'organisme et qui entretient l'inflammation. Ces nouveaux médicaments sont très efficaces mais sont cependant très onéreux, et doivent être administrés à l'hôpital par injection intraveineuse ou sous-cutanée. D'autres molécules découvertes récemment permettent d'empêcher la production de cette cytokine en agissant à l'intérieur des cellules qui la produisent. Ce projet est consacré à l'étude de l'effet d'une de ces nouvelles molécules d'intérêt. Le modèle animal utilisé est une colite induite par ingestion de sulfate de dextran chez la souris. Ce modèle est largement documenté dans la littérature comme étant représentatif des pathologies humaines (comme la maladie de Crohn). Les molécules d'intérêt seront administrées selon plusieurs voies : intra-péritonéale, intraveineuse, par voie orale, ou sous forme de comprimés. Huit à neuf jours après administration, les effets de chaque voie d'administration sur l'inflammation seront évalués sur prélèvement d'organes en post mortem par les analyses appropriées. Le nombre total de souris est de 300 pour une étude sur 5 ans. Pour réduire le nombre d'animaux, les effets anti-cytokines des formulations étudiées ont été préalablement vérifiés sur culture cellulaire in vitro. Mais l'effet sur le système immunitaire global ne peut pas être déterminé in vitro et demande le recours à l'expérimentation animale. La taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats a été réduite au maximum grâce aux données de la littérature concernant ce modèle très reconnu, robuste et reproductible. La colite induite chez les animaux dépend de la dose de sulfate de dextran ingérée. Les doses les plus basses, 1 à 3%, ont été choisies de façon à obtenir une inflammation intestinale modérée et totalement réversible après arrêt du traitement, mais suffisante pour voir les effets bénéfiques de nos formulations. Pour éviter toute souffrance, les prélèvements sanguins se feront sous anesthésie

générale. Afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, ceux-ci seront suivis quotidiennement, et leur état de santé évalué. L'usage d'anti-inflammatoire et d'antalgiques n'étant pas possible dans ce modèle, les animaux montrant une trop grande souffrance ne seront plus soumis à l'administration de sulfate de dextran. Les symptômes étant réversibles, l'inflammation se résorbera, entraînant la disparition de la douleur. Par ailleurs, les souris seront hébergées en milieu enrichi par de petits abris de nidification. Les avantages escomptés de ce projet sont de trouver une voie d'administration efficace de nos formulations, idéalement sous la forme de comprimés, ce qui rendrait possible un traitement thérapeutique non invasif et à domicile.

12420 Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer la capacité d'un candidat médicament à favoriser la mémoire à court terme chez le rat en utilisant le test de reconnaissance d'objets.

Le test de reconnaissance d'objets est un modèle reconnu de mémoire à court terme chez le rat. Ce modèle est basé sur l'activité exploratoire spontanée des rongeurs et n'implique pas d'apprentissage de règle ou de conditionnement des animaux. Il a été démontré que ce modèle était sensible aux effets de l'âge et à d'autres causes de dégénérescence cérébrale touchant la mémoire.

Le projet consiste à évaluer l'effet de futurs médicaments susceptibles d'améliorer le quotidien des patients souffrant de maladies neurodégénératives, spécifiquement la mémoire à court-terme qui est le type de mémoire touché en premier lors du déclin cognitif des patients Alzheimer. Pour cela, les animaux seront soumis à 2 types de protocoles dans le test de reconnaissance d'objets et sera étudié :

- la capacité du candidat médicament à retarder le déclenchement de l'oubli, phénomène naturel
- la capacité du candidat médicament à réverser un déficit mnésique induit expérimentalement.

Dans chaque protocole, les effets du candidat médicament pourront être comparés à ceux d'un composé de référence connu pour améliorer la mémoire à court terme dans ce test.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 5400 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R: remplacement, réduction et raffinement

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la mémoire. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le rat est l'une des espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- des conditions environnementales et d'hébergement optimales
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures les moins invasives possibles
- le suivi des signes cliniques
- des points limites adaptés
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

12421 Selon l'application de l'arrêté du 22 janvier 2014 fixant le cadre national des formations conduisant à la délivrance des diplômes nationaux de licence, un parcours de Physiologie Animale et Neurosciences en Licence « Sciences de la Vie » doit être délivré suite à un enseignement théorique

et pratique en lien avec l'étude des grandes fonctions physiologiques chez le mammifère et chez l'homme. De fait, les compétences requises nécessitent un enseignement pratique dédié à l'expérimentation animale afin d'illustrer les concepts majeurs de la physiologie en conditions concrètes par l'application d'une méthodologie de type recherche scientifique en biologie. Au-delà de l'acquisition de connaissances et de compétences propres à une formation scientifique initiale, les objectifs de ce type de parcours de licence correspondent à la poursuite d'études dans des masters de type biologie-santé impliquant une insertion professionnelle dans des laboratoires de recherche et développement de l'industrie pharmaceutique et des laboratoires de recherche académique qui nécessite des apprentissages en lien avec les problématiques de ces laboratoires. En conséquence, l'enregistrement de paramètres biologiques et la mise en évidence de régulations nerveuses et hormonales ainsi que d'activités pharmacologiques sur le rat anesthésié semblent primordiaux pour sensibiliser et instruire les étudiants aux pratiques des études précliniques obligatoires dans le développement d'une nouvelle molécule candidat médicament.

Afin d'atteindre ces objectifs de formation méthodologique et pratique, les études sont réalisées sur plusieurs séances réparties sur le second semestre de la troisième année de licence. Les différentes séances permettent aux étudiants, après une étape d'observation des structures anatomiques, d'être initiés aux techniques opératoires et de mise en place de cathéters intraveineux et de canules et de capteurs afin de mesurer l'impact de substances pharmacologiques sur différents paramètres physiologiques (pression artérielle, mouvements respiratoires, cœur isolé perfusé).

Selon la règle des 3R établie par Russel et Burch, ce projet visant à répondre aux exigences du Programme Pédagogique National prévoyant des travaux pratiques d'initiation à l'évaluation de l'activité biologique de molécules médicamenteuses sur des modèles *in vivo*, le recours à des modèles animaux est donc incontournable, empêchant le remplacement par des méthodes alternatives (Remplacer). De plus, selon le nombre d'étudiants, il est prévu d'utiliser au maximum 65 rats par année universitaire pour ce projet soit un maximum de 325 rats sur 5 ans. Ce nombre est un compromis nécessaire pour répondre aux obligations pédagogiques relatives au diplôme en termes d'observation et de pratique technique. En effet, au cours de chaque séance, les étudiants se répartissent en binôme ou trinôme afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés ; par ailleurs 2 procédures expérimentales ont été associées (Réduire). Enfin, pour toutes les séances de travaux pratiques, les études sont réalisées sur animaux anesthésiés selon une méthode raffinée assurant l'anesthésie totale et aucun animal n'est réveillé à l'issue de l'expérimentation (Raffiner).

12422 Dans le monde, le nombre de patients atteints d'une maladie neurodégénérative (comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson), ou psychiatrique (comme la schizophrénie et la dépression), est estimé proche du milliard. L'allongement de la durée de vie est un facteur majeur d'augmentation de ce nombre. Le retentissement social pour les patients et leurs familles est considérable en raison des handicaps moteurs, intellectuels et psychiques qui en résultent.

Ce projet vise à utiliser le poisson zèbre (*Danio rerio*) pour sélectionner des candidats médicaments dans le traitement des maladies neuropsychiatriques. La recherche de nouveaux médicaments repose sur une première étape d'identification de molécules efficaces sur leur cible au moyen de tests *in vitro*. L'efficacité thérapeutique des molécules sélectionnées *in vitro* ne peut être démontrée qu'après évaluation dans un organisme complexe vivant. Les modèles de poisson zèbre se situent à l'interface des modèles cellulaires ou invertébrés (vers nématode *C. elegans* ou mouche du vinaigre *D. melanogaster*) et des modèles vertébrés plus évolués (rongeurs). Ils constituent un bon compromis entre nos besoins pour les premières étapes de sélection *in vivo* et la nécessité de disposer d'un système *in vivo* à la physiologie la plus proche possible de celle de l'homme. Le poisson zèbre présente les avantages d'être de petite taille, à forte fécondité, au développement très rapide. La transparence et la petite taille des larves facilite les approches d'imagerie non invasive sur animal entier, et leur perméabilité aux petites molécules permet une administration facile de traitement. Le génome du poisson zèbre, est complètement séquencé et présente une forte homologie avec celui de l'homme (équivalence à 71% des gènes humains). L'homologie physiologique avec les mammifères est également élevée, avec notamment conservation de

l'organisation du cerveau et des neurotransmetteurs. Des similitudes dans le répertoire comportemental existent également (activité locomotrice, réponses conditionnées, comportement social, mémoire). L'utilisation du poisson zèbre vise à remplacer en partie l'utilisation de mammifères (rongeurs) pour atteindre les mêmes objectifs. In fine, le poisson zèbre pourrait remplacer le rongeur dans certaines études.

Les modèles poisson zèbre se justifient en regard de l'application de la règle des 3R :

- Au niveau inter-espèce en permettant de réduire le nombre d'animaux vertébrés supérieurs (rongeurs) qu'il faudrait utiliser pour atteindre les mêmes objectifs. In fine, le poisson zèbre pourrait remplacer le rongeur dans certaines études.

- Au sein même de l'espèce : la larve peut remplacer le juvénile et l'adulte dans certaines études. Par définition, les larves jusqu'à 5 jours post-fécondation (jpf) n'ont pas encore besoin d'apport alimentaire extérieur et ne rentrent pas dans le scope de la directive européenne.

Ce projet est constitué des étapes suivantes :

1) Induction de modèles de pathologies neuropsychiatriques chez le poisson zèbre. La plupart des inductions de modèles découle de modifications génétiques (lignées spontanément mutantes ou modifiées génétiquement pour les gènes impliqués dans la pathologie humaine). D'autres modèles sont obtenus en administrant des agents chimiques ou des préparations biologiques destinées à modifier le fonctionnement du système nerveux à des stades précoces de développement du poisson (avant 5 jpf).

2) Phase de caractérisation, pour chaque modèle, du degré d'atteinte fonctionnelle sur le plan morphologique, comportemental, biochimique/biologique ou histologique. Selon le modèle utilisé, la caractérisation peut être réalisée à des stades précoces de développement jusqu'à 20 jpf maximum.

3) Phase de validation pharmacologique du modèle. Le but est de démontrer qu'il est possible de réduire ces signes de pathologie neuropsychiatrique (observés à des stades de développement définis dans la phase de caractérisation) ou de ralentir leur apparition en traitant avec des molécules de référence non commercialisées mais dont le profil pharmacologique est connu.

4) Sélectionner nos traitements pharmacologiques (préalablement testés par des approches in vitro) les plus efficaces en amont des études complémentaires qui seront réalisées sur des animaux vertébrés supérieurs (rongeurs) et, in fine, pouvant être évalués ensuite chez l'homme.

Les phases 2) et 3) permettent d'appréhender le nombre et la constitution des groupes d'individus qui sont nécessaires pour la phase 4). Lorsque suffisamment de données pharmacologiques sont réunies, les études font l'objet de consultations statistiques pour réajuster si besoin le nombre de poissons nécessaire.

Aucun poisson, quel que soit son stade de développement, ne sera utilisé pour des études d'efficacité si le modèle n'est pas validé préalablement sur le plan morphologique, comportemental, biochimique/biologique ou histologique. Dans certains cas, il est possible de combiner plusieurs mesures expérimentales sur un même poisson, tout en maintenant le bien-être animal, ce qui réduit ainsi le nombre total d'animaux utilisés. Par exemple, une étude histologique ou une mesure biochimique peuvent être réalisées à la suite d'une mesure de l'activité locomotrice. Par ailleurs, dans les études histologiques ou de dosages biochimiques, un lot d'individus peut servir à évaluer plusieurs paramètres.

On suppose pouvoir réaliser une soixantaine d'études par an impliquant des poissons de plus de 5 jpf, avec un nombre d'individus par étude d'environ 100. Ainsi, sur la durée du projet prévue pour 5 ans, environ 30000 poissons de plus de 5jpf seront utilisés, 2 tiers pour les caractérisations de modèles, 1 tiers pour les études d'efficacité de traitements pharmacologiques.

Tous les poissons sont maintenus dans des bacs communautaires, répondant à leur instinct grégaire. Selon l'âge des alevins, des artémies (petits crustacés) sont apportés en complément du régime alimentaire et contribuent à enrichir l'environnement en favorisant leur comportement de chasse.

Tous les poissons de ce projet font l'objet d'un suivi quotidien réalisé par les expérimentateurs et le personnel assurant leur soin. Ce suivi permet d'identifier tout signe de souffrance et de soustraire les animaux des études en cas d'atteinte des points limites définis. Il sera accru pour les lignées de poissons génétiquement altérées susceptibles de présenter un phénotype dommageable.

Le projet est de degré de gravité modéré, pour un objectif thérapeutique important chez L'homme.

12423 Les biomarqueurs obtenus par la technique d'imagerie en clinique dans le diagnostic et les prises en charge thérapeutiques sont devenus incontournables. Une amélioration constante de ces techniques permet l'élaboration de dispositifs plus performants adaptés aux systèmes d'imagerie destinés à l'homme lors d'assistance chirurgicale.

Le développement de l'imagerie préclinique in-vivo permet des approches translationnelles applicables à l'homme. Aucune expérience d'imagerie in vitro, ne peut remplacer l'expérience d'imagerie réalisée sur un animal vivant avec sa complexité anatomique et physiologique. L'imagerie in vivo du petit animal est donc une technologie en pleine expansion. Les systèmes d'imagerie optique basés sur la détection de la fluorescence à résolution macroscopique (Spectrum-CT® ou Odyssey®) et un microscope endoscopique (Cellvizio®) à résolution au niveau cellulaire, permettent de tester non seulement des sondes fluorescentes innovantes mais également de visualiser les effets des produits pharmacologiques sur les paramètres de l'image obtenue dans différentes régions cérébrales et organes périphériques. Ces techniques d'imageries minimalement invasives permettent de suivre au cours du temps le développement d'une pathologie et l'efficacité d'un traitement thérapeutique sans avoir à euthanasier des animaux à différents intervalles de temps. En suivant en longitudinal le même animal (suivi de l'évolution d'une pathologie ou d'un traitement), ces techniques d'imageries conduisent à diminuer le nombre total d'animaux à utiliser.

Ces techniques d'imageries utilisant des sondes fluorescentes moléculaires variées participeront à l'évaluation du potentiel thérapeutique, de la visualisation in-vivo de l'expression de promoteurs ou de gènes d'intérêt, de la biocompatibilité, de la toxicité, de la cinétique et des effets doses d'une entité pharmacologique (petites molécules, peptides, plasmides DNA, SiRNA, Anticorps...) d'un bio matériel synthétique ou naturel ou d'un hydrogel-composite synthétique.

Des animaux transgéniques à phénotype non dommageable pourront être étudiés dans le cadre de ce projet

Les études réalisées au sein du Centre de Recherche sont encadrées par des consignes établies et validées par le Comité d'Éthique, intégrant tous les aspects relatifs à l'utilisation des animaux (l'hébergement, les soins, la manipulation, les expérimentations), et ayant toutes pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal. Par ailleurs, chaque procédure impliquant l'utilisation d'un animal est soumise à approbation par le Comité d'Éthique, avant toute intégration des animaux dans les études. Un support en bio-statistiques est apporté par des experts de la spécialité, afin d'optimiser et réduire le nombre d'animaux utilisés dans les études. Enfin, les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux.

Ce projet couvre l'utilisation de maximum 6000 rongeurs pour 5 ans.

12424 En Europe comme aux Etats-Unis, le cancer est actuellement la seconde cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires. En France, cette pathologie provoque environ 33 % des décès chez les hommes et 23 % chez les femmes. Il est donc primordial de s'intéresser à cette maladie et de trouver de nouvelles thérapies.

Les cellules cancéreuses sont initialement des cellules normales qui ont acquis, au cours du temps, un certain nombre de caractéristiques faisant qu'elles ne répondent plus au système de régulation de l'organisme et prolifèrent indéfiniment pour former une tumeur maligne et/ou des métastases.

Le mésothéliome est un type de cancer très rare. Il apparaît habituellement dans la plèvre (membrane qui entoure les poumons). Dans ce cas, il porte le nom de mésothéliome pleural et représente 70 à 80 % de tous les cas de mésothéliome. L'espérance de vie des patients atteints de ce cancer est 3 à 12 mois.

Un enjeu majeur pour la recherche consiste donc à trouver de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement ces cellules cancéreuses tout en limitant les effets secondaires sur l'organisme.

Pour tester l'activité de nouveaux composés, des tests in-vitro sont systématiquement mis en place sur des cellules en culture, mimant artificiellement la pathologie de l'homme.

Grâce à ces tests in vitro, des molécules actives sont sélectionnées avant d'être testées, en seconde intention, dans des modèles in vivo de souris porteuses de tumeurs afin de démontrer leur activité et leur efficacité anti-tumorale. Les tests in vitro ne sont pas suffisants car c'est dans un organisme vivant complet que l'on peut mesurer les effets pharmacologiques d'une molécule anti-cancéreuse.

Dans le cadre de la recherche de traitements des cancers du mésothéliome, les études précliniques in vivo classiques consistant à la greffe de tumeurs en sous cutanée (sous la peau des souris) ou en intrapéritonéal (dans l'abdomen) ne sont pas les modèles les plus relevant par rapport à la pathologie chez l'homme. Les modèles dits orthotopiques et qui consistent à greffer les tumeurs au niveau de leur localisation chez l'homme sont plus adaptés et très bien décrits dans la littérature. Leur intérêt repose sur le fait qu'ils miment l'environnement tumoral observable chez le patient. Un modèle de greffe orthotopique au niveau de la plèvre de la souris doit ainsi permettre de mieux comprendre la biologie du cancer du mésothéliome et de tester l'efficacité de différents traitements.

Ce projet va donc consister à mettre au point un modèle murin de mésothéliome pleural par greffe orthotopique (en intra pleural) de lignées tumorales.

Ce projet va intégrer différentes phases de mises au point, visant dans un premier temps à maîtriser le geste technique de l'injection en intra pleural, et suivre avec précision la croissance tumorale grâce à deux méthodes (la luminescence de la tumeur et le dosage d'un biomarqueur dans le plasma). Pour valider ce modèle, le suivi de la croissance tumorale devra être précis et la fenêtre d'action thérapeutique suffisamment large pour permettre de tester des molécules. Une molécule de référence sera enfin testée pour confirmer la fiabilité et la prédictivité de ce modèle pour les études d'efficacité de thérapies qui pourront être mises en œuvre par la suite.

L'imagerie optique, de plus en plus utilisée en recherche, va permettre une détection précoce des cellules tumorales dans les organes profonds de l'animal et un suivi du développement tumoral et/ou métastatique sur un même animal au cours du temps, ce qui va contribuer à diminuer considérablement le nombre d'animaux utilisés.

Les souris seront greffées par des lignées tumorales issues de patients. Pour éviter les phénomènes de rejet de greffe, des souris immunodéprimées seront utilisées. Les souris immunodéprimées étant extrêmement sensibles à l'environnement extérieur, elles seront protégées dans un secteur à confinement spécifique avec des procédures d'accès, des conditions d'hébergement et de manipulation strictes appliquées par tout le personnel y intervenant, afin de prévenir tout risque de contamination.

L'état général des souris sera surveillé de façon intensive afin d'identifier le plus précocement possible les éventuels signes de souffrance et d'appliquer les points limites prédéfinis si nécessaire.

Tout au long de l'étude, les souris seront dans la mesure du possible logées en groupes sociaux et un enrichissement de milieu, sous forme de tubes de coton à décortiquer, sera apporté de manière à favoriser leur instinct de nidification.

Cette mise au point est primordiale pour ensuite tester les différentes molécules candidates pouvant avoir un intérêt thérapeutique dans ce type de cancer.

Compte tenu des différentes conditions expérimentales qui vont être testées, la mise en place de ce modèle va nécessiter environ 210 souris naïves.

12425 Notre société a développé une thérapie non virale basée sur le transfert par électrotransfert dans le muscle ciliaire d'un plasmide codant une protéine thérapeutique.

La présence du plasmide dans ces cellules permet une expression localisée et durable de la protéine cible ce qui permet ainsi d'espacer les traitements chez les patients.

Nous développons deux plasmides codant chacun des protéines visant deux mécanismes identifiés lors du processus de dégénérescence des photorécepteurs (cellules de la vision).

Nous avons montré que les deux protéines produites localement dans l'œil permettent de prévenir la perte des photorécepteurs dans des modèles induits de dégénérescence rétinienne (rat). Ces protéines sont donc chacune un traitement potentiel pour les patients atteints de rétinopathie pigmentaire et leur association permettrait de potentialiser le traitement.

L'objectif de ce projet est de démontrer la faisabilité d'administrer un seul plasmide codant les deux protéines. Nous avons sélectionné la structure de notre plasmide permettant l'expression simultanée des deux protéines, nous devons maintenant valider la construction en examinant les profils d'expression intraoculaires des deux protéines et en les comparant à ceux préalablement définis lorsque les protéines sont codées chacune dans un plasmide.

Ce projet durera un an et nécessitera l'utilisation de 90 rats. Il a été élaboré dans le cadre de la règle des 3R. Il nécessite d'avoir recours à des animaux vivants car il n'existe pas de modèle *in vitro* représentatif de l'électrotransfert du muscle ciliaire. Une procédure expérimentale standardisée (électroporation du muscle ciliaire) a été mise au point afin de réduire de façon importante le nombre d'animaux à utiliser en obtenant des résultats statistiquement exploitables. Enfin, les animaux seront stabulés 2 par cage au minimum une semaine dans leur nouvel environnement avant toute manipulation afin d'éviter le stress. Ils bénéficieront d'un environnement enrichi et seront anesthésiés (anesthésies locale et générale) lors des procédures afin de limiter le stress de la manipulation et de la contention et une éventuelle douleur (raffinement).

12426 L'implantation de biomatériaux à visées thérapeutiques chez l'homme et chez l'animal est réglementairement précédée d'une phase au cours de laquelle ces biomatériaux sont évalués en termes de sécurité pour la personne ou l'animal qui les recevra ainsi que pour leur efficacité. Lorsque ces biomatériaux sont une évolution de produits existants ils sont de surcroît comparés à ces derniers.

En fonction de la nature et de la taille des biomatériaux, différentes espèces animales doivent être utilisées pour ces études comme modèle de l'Homme ou de leurs propres congénères.

Depuis 2008, notre établissement a participé à des études de ce type concernant des biomatériaux fixés sur l'os (vis corticales, plaques, ligaments artificiels), des biomatériaux visant à la reconstruction de fragments osseux manquants (différentes préparations de type apatite, support de cicatrisation) ou des biomatériaux destinés à accélérer la cicatrisation tissulaire (cutanée ou viscérale) ou à combattre les hémorragies.

Ces expérimentations sont réalisées conformément à la norme ISO 10993 ou sa version américaine intitulée "FDA-GLP biomaterials testing" et les résultats des essais réalisés dans notre établissement peuvent directement être utilisés pour les demandes d'autorisation d'essais cliniques chez l'Homme auprès des comités de protection des personnes et de l'agence nationale de sécurité du médicament ou de l'agence nationale du médicament vétérinaire pour les essais cliniques chez les animaux. Même lorsque le risque pour les patients est pressenti comme faible, cette évaluation d'efficacité et de sécurité préalable ne peut pas réglementairement être remplacée par des essais *ex vivo*.

Le nombre d'implants à placer est défini par la norme citée ci-dessus (typiquement $n=20$ de chaque type). Le nombre d'animaux est réduit d'une part en posant sur le même animal plusieurs types d'implants, ce qui permet un traitement statistique en échantillons appariés, et d'autre part en réalisant parfois deux actes chirurgicaux sur le même animal lorsque des durées de cicatrisation différentes doivent être comparées. Chaque procédure nécessite au final de placer les biomatériaux sur un ou plusieurs groupes d'animaux compris entre 8 et 40 individus. Nous envisageons de répéter cette procédure jusqu'à 4 fois chaque année et de ce fait le nombre total d'animaux sur les cinq années de l'autorisation de projet sera de 400 rats, 600 lapins, 140 chiens, 280 moutons et 880 porcs (2300 animaux au total).

Tous les animaux bénéficient de procédures d'anesthésie et d'analgésie adaptées à leur espèce. Dès que cela ne nuit pas aux résultats expérimentaux, les animaux sont hébergés groupes sociaux compatibles et bénéficient d'un enrichissement du milieu (variable selon l'espèce).

12427 La brucellose est une maladie infectieuse causée par une bactérie du genre *Brucella*. Elle est répandue à travers le monde et touche l'homme, ainsi que les ruminants domestiques ou sauvages, ainsi que les suidés (porcs et sangliers). Chez l'animal, les symptômes de la brucellose sont des avortements, une réduction de fertilité et des pertes en lait. De plus, tout animal ou troupeau non certifié indemne de brucellose ne peut pas circuler librement dans le monde. La brucellose peut donc être responsable de pertes économiques importantes. Bien que le réservoir de la brucellose soit essentiellement animal, *Brucella* se transmet facilement à l'homme principalement par consommation de lait cru ou inhalation d'aérosols contaminés. La maladie chez l'homme se traduit par des fièvres ondulatoires, douleurs, maux de tête et/ou faiblesse. Elle peut évoluer vers une forme chronique pouvant induire de sérieuses complications ostéo-articulaires. Curieusement, il a été montré que *Brucella abortus*, une des bactéries responsables de la brucellose chez l'homme, peut se transmettre de d'homme à homme par greffe de moelle osseuse. La moelle osseuse est le siège de l'hématopoïèse (le phénomène génération des cellules du système immunitaire à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSHs)). Le rôle de la moelle osseuse dans l'infection par *Brucella abortus* est encore inconnu. C'est pourquoi, la compréhension des mécanismes de *Brucella* lors de son interaction avec la moelle osseuse nous permettra de proposer un meilleur traitement contre la maladie.

Bien que la souris ne soit pas un hôte naturel de *Brucella*, nous utiliserons ce modèle pour plusieurs raisons :

- a) L'infection n'induit ni perte de poids, ni douleurs, ni fièvre et il y a clairance de la bactérie un an après l'infection.
- b) *Brucella* infecte et se multiplie dans les organes du système réticulo-endothélial, comme chez l'homme.
- c) Il existe des souris dans lesquelles le patrimoine génétique des cellules-souches hématopoïétiques a été modifié dans le but d'étudier l'hématopoïèse.

Pour ce projet, nous utiliserons des souris sauvages et des souris ne possédant pas la molécule susceptible de reconnaître *Brucella*, présente dans les CSHs. Dans un premier temps, ces souris seront infectées avec *Brucella* et leurs cellules hématopoïétiques seront isolées à différents temps post-infection pour des analyses biochimiques. Dans un second temps, une greffe des cellules hématopoïétiques de souris infectés sera effectuée sur des souris saines afin d'étudier la capacité des CSHs des souris infectées à induire la génération d'un système immunitaire dans un environnement sain. Toutes les expériences de ce projet seront effectuées dans notre centre, grâce aux appareils dédiés à l'étude des cellules du système immunitaire disponibles. Pour répondre à la règle des 3R, une estimation de 1104 souris nécessaires sur 5 ans a été effectuée, à partir des données préliminaires, pour obtenir une puissance statistique d'au moins 80% et une erreur de première espèce de 5%. L'hébergement des animaux se fera en confinement, adapté en cages individuellement ventilées, à raison de 3 à 4 souris par cage de 500 cm² pour favoriser l'enrichissement social, dans un laboratoire de niveau 3 de biosécurité (BSL3) conformément à la réglementation européenne en vigueur (environnement contrôlée : température et ventilations régulées, lumière avec un cycle de 12h, hygrométrie). L'environnement est enrichi par l'ajout de coton et copeaux compressés utiles à la nidification. Un délai d'une semaine entre la réception des souris et la date de l'infection sera respecté. En effet, La souris n'est pas l'hôte naturel de *Brucella abortus* (l'espèce qu'on utilise pour les expériences). Par conséquent la souris ne développe pas les symptômes de la brucellose comme perte de poids, fièvre ou douleurs. Cependant après l'infection les souris seront surveillées quotidiennement par le personnel responsable du bien-être des animaux de la plateforme BSL-3 : tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques (isolement, automutilation, posture anormale, difficultés à se déplacer et

s'alimenter, pelage, yeux mi-clos, distention abdominale, déshydratation) sera retiré de l'expérience et sera euthanasié.

12428 La myopathie centronucléaire liée à l'X (XLCNM, X-linked centronuclear myopathy), également appelée myopathie myotubulaire, est caractérisée par une hypotonie néonatale sévère et un décès précoce. C'est la plus commune et la plus sévère des myopathies centronucléaires, pathologies congénitales très sévères caractérisées par une faiblesse musculaire, une forte atrophie et des anomalies de la structure des fibres musculaires. La XLCNM est engendrée par des mutations du gène codant pour la myotubularine (MTM1), une phosphoinositide phosphatase. Sur cette base, un modèle murin *Mtm1* knockout (délétion de l'exon 4) hémizygotés (*Mtm1*-/y) a été créé. Il permet de reproduire le phénotype provoqué par la XLCNM avec des caractéristiques histologiques classiques de cette pathologie comme une position anormale des organelles, un défaut de localisation des noyaux et une atrophie musculaire, associées à une faiblesse musculaire progressive, conduisant à l'euthanasie des animaux entre 6 et 14 semaines.

Pour comprendre le rôle physiologique du gène *Mtm1*, et comment ses mutations sont responsables de ces pathologies, selon le principe des 3R et pour satisfaire au remplacement, des modèles cellulaires ont d'abord été utilisés. Les modèles cellulaires bien que permettant de réduire l'utilisation des animaux, atteignent rapidement leurs limites car ils ne rendent pas compte des interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme. Afin d'obtenir des informations sur le rôle de cette protéine chez l'Homme et notamment au cours du développement de la XLCNM, comme il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de tenir compte de toute la complexité et de toutes les interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme, le recours à un modèle animal apparaît comme la meilleure alternative pour étudier les fonctions de la protéine *Mtm1*. Le modèle murin *Mtm1*-/y, précédemment généré, est donc indispensable pour comprendre, *in vivo*, le rôle de *Mtm1* dans ces pathologies, ses interactions, dans le muscle sain et pendant le développement des pathologies musculaires. De plus, la réalisation de ce projet pourrait permettre la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. L'objectif de cette étude est donc de poursuivre la caractérisation de la lignée *Mtm1*-/y (tests phénotypiques pour évaluer les fonctions musculaires des animaux : mesure de la force du corps, de la coordination motrice, de l'endurance et de la résistance à la fatigue ...) et de tester l'éventuelle amélioration du phénotype de ces animaux grâce à différentes approches thérapeutiques.

Afin de satisfaire aux principes des 3R, le phénotype des souris sera analysé *in vivo* / *in situ* et les tissus seront prélevés sur ces mêmes animaux pour des expériences *in vitro* ultérieures. Plusieurs procédures expérimentales (maximum une par jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (principe de réduction). Quinze souris seront utilisées par groupe pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Dans le cadre du raffinement, et afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, elles seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé.

Dans ce contexte, notre intervention aura pour objectifs de mettre en place des stratégies permettant de garantir la pérennité du modèle murin *Mtm1*-/y. En effet, nous évaluerons la fertilité des mâles hémizygotés et en fonction des résultats obtenus nous mettrons en place une stratégie de cryoconservation de la lignée par le sperme ou sous forme d'embryons. Afin de garantir un statut sanitaire sain (SPF) pour ces animaux, si le sperme des mâles hémizygotés est fertile, la lignée sera revitalisée par fécondation *in vitro* (FIV), dans le cas contraire, une décontamination par transfert d'embryons issus d'accouplements naturels entre des femelles hétérozygotés et des mâles wild type sera réalisée.

Lors des croisements permettant d'amplifier la colonie, le recours aux femelles *Mtm1* hétérozygotés ne présentant pas de phénotype particulier pour transmettre la mutation, nous permettra de réduire au maximum l'utilisation des mâles *Mtm1*-/y dont le phénotype est délétère.

Un des objectifs de notre action est de satisfaire la règle des 3R dans le cadre de laquelle s'inscrivent les procédures de cryoconservation et de décontamination par transfert d'embryons. En effet, la cryoconservation est une technique qui permet non seulement de réduire l'utilisation

d'animaux vivants dans les échanges de modèles entre instituts ou centres de recherche mais aussi de sécuriser ceux-ci sur la maîtrise des conditions sanitaires lors des échanges. De plus, la technique de transfert d'embryons permet l'acquisition d'un statut sanitaire de haut niveau, mais aussi de réduire de façon conséquente la part d'animaux utilisés lors de la phase d'élevage des animaux utilisés en expérimentation. D'un point de vue pratique, le bien-être des animaux sera respecté tout au long du projet, répondant ainsi au besoin de raffinement décrit dans la règle des 3Rs. Les transferts d'embryons sont réalisés sous anesthésie générale suivie d'une surveillance renforcée des animaux. Cette procédure est appliquée sur l'ensemble de nos projets. Cette technique est aujourd'hui une des bases de la maîtrise du nombre d'animaux utilisés lors de la phase de production des lots destinés à l'expérimentation.

Dans le cadre de ce projet, et pour satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique des cages, et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances régulières nous permettront d'identifier d'éventuelles souris souffrantes et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, aliment spécifique et euthanasie dans les cas les plus graves).

Pour la réalisation de ce projet, nous hébergerons et générerons, en fonction de la fertilité des mâles hémizygotes au maximum 45 souris sur une durée de 5 ans. La règle de la réduction sera appliquée en produisant uniquement le nombre d'animaux requis pour les expériences.

12429 La fibrose désigne une lésion non spécifique d'un organe donné qui va induire la synthèse et sécrétion de matrice extracellulaire conduisant à une altération des fonctions physiologiques de l'organe. La cause de l'initiation d'une fibrose varie d'un organe à l'autre et peut comme c'est le cas dans le poumon avoir une cause inconnue. Le processus fibrotique présente quelques spécificités relatives à chaque organe mais le processus global reste le même. Les cellules appelées myofibroblastes sont les effecteurs principaux du processus fibrosant. Ce sont les cellules qui vont synthétiser de la matrice extracellulaire qui va s'accumuler au sein de l'organe et progressivement altérer son fonctionnement. La fibrose peut toucher de nombreux organes tels que le poumon, le foie, le rein, la peau, le pancréas ou encore le cœur. Il existe à l'heure actuelle deux médicaments qui permettent de ralentir la progression de la fibrose pulmonaire mais aucun traitement ne permet de réverser une fibrose établie.

Afin d'évaluer l'activité des composés issus du screening cellulaire in vitro, il est indispensable de recourir à l'utilisation de modèles animaux relevant des pathologies humaines qui intègrent toute la complexité des interactions intercellulaires et inter-organes. Tous les modèles utilisés sont très bien décrits dans la littérature scientifique et ont été validés avec des composés qui ont montré leur efficacité chez l'homme dans des études cliniques. Les modèles animaux sont sélectionnés en fonction des publications scientifiques sur cette aire thérapeutique. L'objectif est de reproduire au mieux les différents aspects d'une pathologie humaine sur l'animal afin d'évaluer l'efficacité des molécules sur cette pathologie. Les modèles permettant d'induire une fibrose varient selon l'organe ciblé. L'induction de la fibrose chez l'animal est réalisée grâce à l'administration de produits chimiques connus. Les voies d'administration dépendent de l'organe cible.

Cependant avant de tester les composés chez l'animal, ils seront sélectionnés dans un premier temps à l'aide de tests cellulaires afin d'optimiser au maximum le nombre d'animaux utilisés dans les études en respect de la règle des 3R. Seules les molécules présentant une activité sur les tests in-vitro et ayant des caractéristiques pharmacocinétiques adéquates seront testées sur les animaux. Ce système permet de réduire considérablement le nombre de molécules testées chez l'animal et donc le nombre d'animaux utilisés. L'environnement des animaux sera enrichi en fonction des procédures imposées par les différents modèles (couverture chauffante après la chirurgie, eau gélifié, granule mis à disposition...) et des points limites adaptés à chaque modèle sont déterminés afin de préserver le bien-être animal. Nous utiliserons au maximum 10000 animaux sur 5 ans (8 600 souris et 1 400 rats). Le nombre d'animaux utilisés dans les études dédiées au projet fibrose permet de tester entre 20 et 30 composés par an.

12430 1-Objectif scientifique du projet :

Le cancer du sein est le premier cancer féminin en termes de fréquence et la première cause de décès par cancer chez les femmes, avec plus de 600 000 décès estimés en 2018 dans le monde. Sans amélioration dans la prise en charge du cancer du sein, le taux de mortalité lié à cette pathologie aura augmenté de 58% en 2040, pouvant atteindre environ 1 million de décès (WHO). L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est donc primordiale pour faire face à ce problème majeur de santé publique.

La considération du microenvironnement dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est une option prometteuse, et plus particulièrement le microenvironnement immunitaire. Au cours des dernières années, certaines thérapies ciblant le système immunitaire ont déjà démontré des efficacités thérapeutiques sans précédent dans certains types de cancer (mélanome, cancer du poumon). Cependant, à l'heure actuelle, seulement un faible nombre de patients répondent à ces immunothérapies innovantes. Ainsi, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le microenvironnement immunitaire des patientes atteintes de cancer du sein reste primordiale.

Alors que les mécanismes d'évasion au système immunitaire commencent à être bien caractérisés, les événements très précoces qui permettent la détection des cellules pré-néoplasiques restent à ce jour peu compris. Notre projet a pour objectif de déterminer, dans un modèle préclinique murin, les mécanismes importants impliqués dans la réponse immunitaire au stade très précoce (immunosurveillance) de la transformation cellulaire.

2-Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie :

La compréhension des mécanismes impliqués dans la détection précoce, par les cellules du système immunitaire, des cellules transformées devrait permettre de découvrir de nouveaux mécanismes d'échappement qui pourrait être contrecarrés pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, des approches d'immunothérapie innovantes, visant à rétablir la reconnaissance précoce des cellules tumorales par le système immunitaire, représentent une piste majeure de prévention des cancers.

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

Seul un modèle in vivo chez l'animal peut permettre d'étudier les interactions cellulaires des étapes précoces de détections des cellules transformées par le système immunitaire. Pour cela, nous mettons en place, in vitro, un protocole de culture de cellules pré-tumorales issues d'un modèle murin de tumeurs mammaires spontanées, sous forme d'organoïdes. Nous proposons d'étudier, in vivo, les différents paramètres de la réponse immunitaire des souris au cours du développement très précoce des tumeurs issues des cultures d'organoïdes.

Pour chacune des procédures expérimentales, le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et reproductibles (N=10 souris par groupe). Une définition précise des points limites (taille de tumeur modérée n'interférant pas avec le bien-être animal) et une surveillance adaptée des animaux par des personnels compétents permet de limiter au maximum toute souffrance animale.

Ce projet utilisera au maximum 270 souris

12431 Le purpura thrombotique thrombocytopénique acquis (PTT-a) est une maladie rare et grave, touchant le plus souvent l'adulte jeune. Les manifestations de cette pathologie sont une baisse du nombre de plaquettes, une baisse de l'hémoglobine et une souffrance brutale d'un ou plusieurs organes comme le rein et le cerveau. Sans prise en charge adaptée, 90% des patients décèdent [1].

Le PTT-a est lié à la formation de caillots de plaquettes dans les petits vaisseaux de l'organisme, les plaquettes s'agrégeant sur des grandes protéines : les multimères de von Willebrand (VWF-HM), ces multimères étant dégradées par l'enzyme ADAMTS13 en situation physiologique. Deux événements sont nécessaires pour déclencher la maladie : premièrement le système immunitaire des patients inactive l'enzyme ADAMTS13, qui ne peut alors plus dégrader les multimères de von

Willebrand ; et deuxièmement l'activation des cellules endothéliales qui vont libérer brutalement de grandes quantités de VWF-HM.

Dans le cadre d'un projet thérapeutique sur un modèle murin de PTT, nous importons des souris génétiquement modifiées déficiente en ADAMTS13 (souris knock out ADAMTS13) telles qu'elles ont été développées aux USA. Ces souris ont un phénotype dommageable [2], elles ont en effet une tendance à avoir des plaquettes basses et une survie spontanée légèrement diminuée. Il n'y a pas d'effet de ce phénotype dommageable sur la fertilité ni sur la prolificité.

Le plan d'élevage nous a été donné par le laboratoire fournissant les animaux : 1 mâle sera hébergé avec 1 femelle, l'index de prolificité moyen est de 7 souris, avec un rapport mâle – femelle à la naissance de 1 :1.

Afin de respecter les règles éthiques, nous serons attentifs à appliquer la règle des 3R (« réduire, raffiner, remplacer »). Le nombre d'animaux est réduit au strict minimum, et a été déterminé grâce à une feuille de calcul fournie en annexe. Le nombre de souris nécessaire pour l'élevage a été estimé à 120 souris, et le nombre de souris nécessaire pour l'entretien de la lignée a été estimé à 20 souris par an soit 60 souris. Les animaux seront visualisés quotidiennement, et une attention particulière sera accordée aux procédures de raffinement (points limites). Les souris disposeront de nid végétal à base de fibres courtes de coton, utilisé comme enrichissement de l'environnement et matériau de nidification, ainsi que de tunnels afin de réduire l'ennui et de diminuer le stress en stimulant l'activité et en procurant un sentiment de sécurité à l'animal.

12432 Le volume globulaire total correspond au volume occupé par les globules rouges (GR) dans le sang total. En médecine, la mesure du volume globulaire permet le diagnostic et le suivi de la polyglobulie vraie, ou maladie de Vaquez, maladie hématologique se traduisant par l'augmentation du nombre de GR. Les traitements sont lourds, et seule la mesure par la méthode de dilution isotopique permet une mesure fiable et reproductible. Il s'agit de marquer les globules rouges prélevés au sujet avec un isotope radioactif pour faire un traceur. Une fois réinjectés au sujet, sous l'action du cœur, le sang en mouvement dans l'organisme va homogénéiser les GR marqués dans l'ensemble du compartiment sanguin du sujet. A partir des prélèvements sanguins, nous en déduisons le volume sanguin du sujet et son volume globulaire par l'effet de dilution des érythrocytes radiomarqués dans le compartiment vasculaire.

Le marquage des érythrocytes est possible par du [99mTc] Technétium (99mTc) ou du [51Cr] Chrome (51Cr). La méthode de marquage étant différente entre les deux isotopes radioactifs, la stabilité du traceur est différente pouvant induire des biais par décomplexation plus ou moins rapide du radioélément du GR. Ces différences peuvent induire des prises en charge différentes chez un même patient notamment dans un contexte d'arrêt programmé de la production de 51Cr au niveau mondial. L'objectif de cette étude est de déterminer si le choix du radionucléide pour le marquage des GR influe sur le résultat final et donc sur le diagnostic ou le suivi de la polyglobulie vraie. Pour cela nous avons besoin d'effectuer sur le même sujet, le même jour, la détermination du volume globulaire total par les 2 méthodes de marquage. La nécessité d'utiliser des animaux s'explique par le risque lié aux activités radioactives administrées aux sujets. Pour ce type de faibles activités (4 MBq), le risque principal est de type stochastique dont éventuellement des pathologies cancéreuses à long terme (plusieurs décennies). Les animaux utilisés seront euthanasiés à la fin de l'expérience soit bien avant la survenue de potentiels effets délétères. Le modèle animal choisi, en l'occurrence le rat, est bien adapté à l'étude car c'est un modèle animal utilisé fréquemment pour l'exploration du système cardiovasculaire. L'expérimentation animale sera conduite selon les normes réglementaires (règle des 3 R). Afin de limiter la variabilité inter-individuelle, l'administration des GR radiomarqués au [99mTc] Technétium (99mTc) ou au [51Cr] Chrome doivent être effectués sur le même sujet, le même jour à des activités adaptées et sans conséquence pour l'animal sur la durée de l'étude. Il n'est pas possible d'utiliser une méthode in vitro car nous devons prendre en compte les paramètres d'une circulation sanguine in vivo. (Remplacement). Pour démontrer une absence de différence entre les 2 méthodes de radiomarquage, un maximum de 90 rats sera utilisé en 2 lots de 45 rats (avec ou sans traitement par EPO) pour le modèle d'étude de coefficient de variation (Réduction). En cas d'apparition de différence pendant l'expérience, les animaux restants ne seront

pas utilisés. 0,5 mL de suspension d'érythrocytes marqués préalablement au ^{99m}Tc et au ^{51}Cr sera administré simultanément à un même animal, afin de limiter la variabilité inter-individuelle. Les administrations se feront par voie intraveineuse dans la veine caudale du rat anesthésié avec de la bupivacaine. Puis, sous anesthésie, des prélèvements de 1mL de sang chacun seront effectués au niveau de la queue de l'animal à 10, 20 et 40 minutes après l'administration des globules rouges marqués. Lors du dernier prélèvement, l'animal sera avant euthanasié par une injection IP de 1mL de Dolethal (Raffinement). La totalité de l'expérience animale étant réalisée sous anesthésie, l'animal ne sera pas en état de souffrance ou de stress.

12433 Pour le développement de nouveaux médicaments, il est nécessaire d'étudier le devenir de la substance active dans l'organisme, déterminer l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination du composé (ADME), des propriétés qui vont influencer la posologie du médicament (dose administrée et fréquence d'administration).

L'objectif de ce projet est la mesure de la biodisponibilité de produits pharmacologiques en cours de développement, molécules actives ou candidats-médicaments chez la souris.

La biodisponibilité est déterminée à partir de prélèvements de sang réalisés suite à l'administration du produit pharmacologique.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, la biodisponibilité et la pharmacocinétique de produits pharmacologiques sera évaluée chez la souris, car c'est l'espèce qui sera utilisée dans le cadre du développement des candidats-médicaments. A ce jour, aucun modèle alternatif (moléculaire et/ou cellulaire) n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre de reproduire l'ensemble des phénomènes biologiques qui sont impliqués dans les mécanismes de dégradation, de transport et d'élimination des composés susceptibles d'affecter l'activité des molécules. C'est pour cette raison, qu'une approche *in vivo* est nécessaire pour déterminer la biodisponibilité des nouveaux candidats-médicaments avant de poursuivre leur développement.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance de l'animal. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes, dans des cages de grande taille enrichies de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi régulier de l'état des animaux. Lorsque la procédure nécessitera d'anesthésier l'animal, la souris sera placée sur un tapis chauffant afin de prévenir une hypothermie durant l'anesthésie et jusqu'au réveil de l'animal.

La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments pour visualiser tous signes de toxicité imprévue qui seraient suivi de l'arrêt de la procédure et nécessiteraient l'euthanasie de l'animal.

Réduire

Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet une mesure efficace de la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Les résultats sont exploités sous la forme de courbes cinétiques. Aucune comparaison statistique n'est requise. La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet ainsi de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Cette procédure répétée, permet de réduire drastiquement le nombre d'animaux utilisés pour la détermination de la biodisponibilité, et sera utilisée lorsque les produits pharmacologiques pourront être mesurés dans un micro-volume de plasma et qu'aucun prélèvement d'organe ne sera requis pour l'analyse.

Les mesures de pharmacocinétique seront réalisées à l'aide de 3 souris par candidat médicament, par dose et par voie d'administration. Il est prévu de mesurer la biodisponibilité de 25 candidats-médicaments par an chez la souris sur une période de 5 ans, soit un maximum de 1050 souris.

12434 L'obésité et le syndrome de l'intestin irritable (SII) sont deux problèmes de santé publique majeurs, leur prévalence étant, respectivement, de 15 et 4,7% en France. De plus, la prévalence du SII est fortement augmentée chez des sujets obèses, de 15 à 30%. L'obésité et le SII sont des pathologies d'origine multifactorielle ayant cependant des mécanismes physiopathologiques communs comme des facteurs psychologiques (stress), des troubles de la motricité et de la sensibilité intestinale, des modifications de la fonction de barrière et de l'environnement luminal (alimentation, microbiote intestinal).

L'obésité et le SII sont des troubles complexes faisant intervenir des interactions inter-organes, le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire pour mieux comprendre ces pathologies. Au regard de la règle des 3R, pour limiter le nombre d'animaux, certaines approches très mécanistiques sont menées sur des modèles cellulaires comme par exemple l'étude des voies de signalisation intracellulaires régulant la fonction de barrière intestinale. Les procédures d'analyses ont été préalablement optimisées pour réduire l'effectif nécessaire par groupe. De plus, pour limiter le stress des animaux, plusieurs points seront mis en place (i) après leur arrivée dans l'animalerie, les souris resteront une semaine en période d'acclimatation avant le début de l'expérimentation ; (ii) les souris seront disposées dans une cage ordinaire au lieu d'une cage métabolique afin de permettre des interactions avec leurs congénères ; (iii) les souris seront disposées à 5 par cage ; (iv) le milieu de la cage sera également enrichi de coton pour leur permettre de réaliser des nids. Pour prendre en charge la douleur, une évaluation de la souffrance sera réalisée deux fois par jour à l'aide d'une échelle validée. Lorsque la somme des scores sera supérieure à 5, les animaux recevront une injection de buprémorphine à la dose de 0.1mg/kg. Si la douleur persiste plus de deux jours, les animaux seront euthanasiés. Lorsque la somme des scores sera supérieure à 7, les animaux seront euthanasiés. Lors des procédures expérimentales, une prise en charge de la douleur pourra également être mise en place par une injection de buprémorphine à la dose de 0.1 mg/kg si besoin.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les interactions entre l'obésité et les symptômes du SII chez la souris. Deux modèles d'obésité, souris génétiquement obèses ou rendues obèses par une alimentation riche en lipides, et deux modèles mimant le SII, un modèle post-inflammatoire et un modèle de stress (stress d'évitement de l'eau), seront utilisés et combinés menant à l'utilisation de 512 animaux. La sensibilité viscérale, la motricité intestinale, la fonction de barrière, ainsi que les voies de signalisation impliquées dans ces processus et le microbiote intestinal, seront étudiées au niveau de l'iléon et du colon. La réponse centrale sera également étudiée en particulier les aires impliquées dans la régulation du stress et de la fonction intestinale (hypothalamus et noyau du tractus solitaire).

Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques expliquant les liens entre l'obésité et le SII.

12435 L'objectif de ce projet s'inscrit dans l'évaluation d'approches de thérapie pour des maladies génétiques rares du muscle, les dystrophies musculaires, pour lesquelles il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement. La thérapie génique est une option envisageable comme stratégie thérapeutique dans ces maladies.

Dans une approche thérapeutique par transfert de gène, le meilleur vecteur pour un transfert dans le muscle squelettique est un vecteur dérivé du virus associé à l'adénovirus (AAV). Il est possible de générer des vecteurs viraux ayant des propriétés de tropisme différent du vecteur initial. Dans ce projet, nous souhaiterions sélectionner d'une part un AAV spécifique à partir d'une banque d'AAV modifié et d'autre part un polypeptidique qui pourra ensuite être inséré dans un AAV pour leur capacité à se transférer de façon préférentielle dans le muscle squelettique, organe cible pour ces maladies, comparé à d'autres organes afin de définir les produits ayant le meilleur tropisme pour le muscle. L'objectif final est de disposer de produits thérapeutiques ayant le meilleur ratio bénéfice/quantité, Il s'agit donc d'une étude de biodistribution pour définir la meilleure option dans une perspective d'utilisation chez l'homme. La nature des produits à l'étape de la sélection impose que cette évaluation de biodistribution se fasse chez des souris nouveau-nés. En effet, la quantité de produit initial qui serait nécessaire pour que la présence du produit sélectionné puisse être

correctement quantifiée chez la souris adulte n'est pas atteignable. Les produits définis dans ce projet seront soit utilisés en propre pour les AAV soit incorporés dans un AAV thérapeutique afin d'en modifier le tropisme de façon avantageuse pour l'efficacité des produits de thérapie génique en vue d'une future application chez l'homme.

Remplacement :. Les études de biodistribution ne peuvent se faire qu'in vivo car évaluent la distribution entre les organes.

Réduction : Un groupe de souris non traitées unique est utilisé pour l'ensemble des groupes, permettant de réduire le nombre de souris.

Les souris nouveau-nés seront générés à partir de couples et non pas de trios. En effet, le nombre de petits générés par trios peut excéder le nombre de petits nécessaires à l'expérience.

Raffinement : Ces études seront menées chez la souris nouveau-né afin d'obtenir une sensibilité suffisante pour une quantification correcte des résultats. Pour éviter le rejet des souris nouveau-nés par leur mère, les femelles primipares ne seront pas incluses dans ce protocole et les gants des expérimentateurs seront frottés dans la litière de la cage avant toute manipulation des nouveau-nés. Dans cette procédure, nous n'attendons pas d'effets délétères particulier des produits injectés à la dose utilisée cependant des points limites sont définis pour éviter toute souffrance potentielle.

Dans ce projet, nous estimons que 360 souris seront utilisées. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études ainsi que sur un calcul de taille d'échantillon permettant une analyse statistique des résultats.

12436 La diminution progressive de la masse musculaire, observée au cours du vieillissement, associée à une perte d'autonomie avec l'âge, représente un enjeu majeur de santé publique.

Notre objectif est de déterminer si deux molécules étroitement liées à la longévité, ici appelées T et F, varient dans le muscle squelettique des souris à vieillissement prématuré.

Nos résultats préliminaires nous ont permis d'observer, dans des biopsies musculaires humaines, une nette diminution de T (à partir de 20 ans). Néanmoins, T est indispensable pour la protection et stabilité de notre matériel génétique lors du vieillissement cellulaire. Nos études in vitro sur des cellules musculaires humaines dans lesquelles une diminution de T a été induite, nous montrent une augmentation du stress oxydant et métabolique, ainsi que son interaction à F, une molécule liée au vieillissement et au bien-être de la cellule. Cette liaison de T à F active F, qui en retour adopte un rôle protecteur des parties sensibles de notre ADN. En effet, plusieurs études ont montré que des variants de F sont retrouvés chez des centenaires et qu'elle a une importance majeure dans la longévité.

Suite à ces approches in vitro qui ont permis de caractériser les mécanismes moléculaires sous-jacents les rôles de T dans le vieillissement, nous souhaitons déterminer si un mécanisme similaire est déployé lors du vieillissement de l'organisme. Nous allons utiliser dans ce PEA un modèle murin de vieillissement prématuré, afin de déterminer si le niveau d'expression de F est corrélé à ce vieillissement pathologique.

Afin de répondre à cette question, nous allons utiliser des souris génétiquement modifiées pour perdre l'expression d'une enzyme clef dans l'allongement de l'extrémité de nos chromosomes à savoir la télomérase (appelée TERT). La perte de cette enzyme favorise un vieillissement prématuré en induisant un raccourcissement de nos télomères. Cependant, il faut attendre plusieurs générations de rétrocroisements avant de voir émerger un phénotype de vieillissement prématuré. Ainsi, les souris de la première génération (G1) ne présentant aucun phénotype dommageable. Les premiers signes de vieillissement prématuré apparaissent à la cinquième génération (G5). Le phénotype de souris a été caractérisé par :

- Mobilité : la diminution de l'activité physique chez les individus G5 à partir de 6-8 mois.
- Alopécie, ulcérations :
- Poils gris apparaissent chez la génération G6 à 6 mois.
- Taux d'alopécie chez les souris de plus de 15 mois : WT : 25%, G3 : 54% et G6 : 60%.

- Apparition d'ulcérations : G1 à 25 mois, G6 à 15 mois. De plus les souris G5 et G6 tardent deux jours de plus à guérir d'une blessure

- Mortalité précoce :

- Augmentation de la mortalité spontanée de 15% entre 3 et 6 mois pour les souris G4 à G6.

- Les individus WT et TR-/- jusqu'à la génération G5 subissent 50% de mortalité à 24 mois, tandis que les G6 atteignent ce taux à 18 mois.

- Dysfonctionnement cardiaque

- Taille et poids :

- Taille réduite.

- Pendant les 6 premiers mois, les souris G1 et G6 présentant des courbes de poids similaires. Cependant, au bout de 10-14 mois les souris G6 perdent entre 20 à 25% de leur poids moyen par rapport aux souris de la génération G1.

- Diminution de la fertilité : la taille moyenne des portées diminue de 9 chez les WT, jusqu'à 5 pour les G4 et G5. La génération G6 ne semble plus être capable de se reproduire.

Dans notre étude, nous allons déterminer les niveaux d'expression de T et F dans les muscles de souris TERT-KO à des générations G1, G4 et G6 âgées de 8 mois. Aussi, nous allons générer des souris TERT-KO G5 (permettant de produire les G6) et TERT-KO G6 présentant un phénotype de vieillissement prématuré. Pour limiter l'impact de ce phénotype sur le bien-être animal, nous avons mis en place un suivi strict et régulier des animaux grâce à l'utilisation d'une grille de score (raffinement).

Pour réaliser ce projet en 5 ans, nous utiliserons un maximum de 60 animaux. Le nombre de souris utilisés dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement robustes. A partir d'un nombre minimum d'animaux (réduction).

Le projet se base sur des résultats scientifiques obtenus in vitro sur des cellules musculaires humaines (remplacement). Cependant, le processus physiologique du vieillissement prématuré ne peut pas être réalisé, à l'heure actuelle, sur des cultures cellulaires. Notre projet consiste à une procédure d'élevage, aucune procédure expérimentale ne sera appliquée sur ces animaux.

Pour limiter l'impact de ce phénotype sur le bien-être animal, nous allons appliquer la règle des 3Rs:

-Raffinement: pour limiter l'impact du vieillissement prématuré, nous avons mis en place un suivi strict et régulier des animaux grâce à l'utilisation d'une grille de score qui définit des points limites clairs, précis et précoces.

-Réduction: pour réaliser ce projet en 5 ans, nous utiliserons un maximum de 60 animaux. Le nombre de souris utilisés dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement robustes, utilisant le programme G-power. Cette méthode nous a permis de définir le nombre optimal d'animaux à utiliser en fonction de l'effet biologique que nous supposons obtenir.

Le projet se base sur des résultats scientifiques obtenus in vitro sur des cellules musculaires humaines (remplacement). Cependant, le processus physiologique du vieillissement prématuré ne peut pas être réalisé, à l'heure actuelle, sur des cultures cellulaires. Notre projet consiste à une procédure d'élevage, aucune procédure expérimentale ne sera appliquée sur ces animaux.

12437 L'obésité, étant associée à de nombreuses pathologies graves (diabète de type II, atteintes vasculaires, hypertension, maladies neurodégénératives, certains cancers), cette pathologie constitue sans conteste un des principaux challenges de santé publique du XXIème siècle. Une consommation excessive d'aliments riches en graisses explique, en partie, ce phénomène.

Notre équipe a récemment montré chez la souris qu'il existait un système de détection gustatif des lipides alimentaires dépendant de la protéine CD36 et qui serait impliqué dans la sélection et la digestion des aliments riches en graisses. Ces données inédites suggèrent l'existence d'une 6ème modalité gustative : le « goût du gras ».

Nos travaux récents indiquent qu'il existe une diminution de la détection oro-sensorielle des lipides alimentaires chez la souris rendue obèse par un régime hyper gras. Nous avons montré que cette altération est liée à une dérégulation du système de détection des lipides au niveau des papilles gustatives. Ce changement s'accompagne d'une modification du comportement alimentaire se traduisant par une consommation préférentielle d'aliments riches en graisses.

A ce jour les mécanismes moléculaires responsables de cette dérégulation du « goût du gras » ne sont pas connus. Une des pistes sérieuses est l'altération du métabolisme du tryptophane se mettant en place avec l'obésité et aboutissant à la production d'un composé neurotoxique susceptible d'altérer le comportement alimentaire : l'acide quinolinique. Comme nous avons découvert récemment (données non publiées) que ce composé est un marqueur important de l'obésité, l'objectif de ce projet sera de déterminer le rôle propre de ce composé sur l'altération de la détection gustative des graisses lors de l'obésité et ses conséquences sur les choix alimentaires et la santé. Les animaux subiront, pendant 15 jours, une injection intrapéritonéale journalière d'acide quinolinique pour mimer le phénomène observé au cours de l'obésité. Les animaux participeront ensuite à des tests de comportement alimentaire afin de déterminer si leur capacité à détecter les nutriments a été altérée.

Ce projet est en adéquation avec la règle des 3R :

- En termes de Remplacement : compte tenu du contexte scientifique (étude du goût) et du contexte expérimental (étude du comportement), le recours au modèle animal est indispensable.
- En termes de Réduction : le nombre d'animaux a été réduit au minimum, un nombre total de 50 souris sera toutefois nécessaire pour une analyse statistique fiable (25 par groupe)
- En termes de Raffinement : les animaux seront hébergés dans des conditions optimales avec de l'enrichissement (frisottis de carton et buchette de bois à ronger) et bénéficieront d'un suivi quotidien de leur état général. Des points limites ont été identifiés et tout animal présentant une dégradation de son état général au-delà de ces points limites sera retiré de l'étude. De plus, un nombre restreint de personnes interviendront afin de limiter le stress des animaux. Ce personnel dispose d'une formation adéquate et est compétent pour détecter précocement l'un des points limites définis pour ce projet.

12438 Les parasites filaires de la famille des Onchocercidae causent des maladies très handicapantes, telles l'éléphantiasis ou la cécité des rivières, et affectent plus de 120 millions de personnes dans les pays tropicaux. Les filaires sont transmises par des insectes hématophages, et se développent ensuite dans le corps humain, où elles peuvent vivre plus de 10 ans. Ces vers vivent en symbiose avec les bactéries intracellulaires *Wolbachia*, nécessaires à leur survie et leur fertilité. Notre laboratoire étudie les mécanismes cellulaires et moléculaires de transmission des *Wolbachia*, et leurs contributions à leurs hôtes filaires. Notre travail a donc pour but de comprendre cette symbiose, afin de la cibler. L'élimination des *Wolbachia* conduit en effet à la mort des parasites filaires adultes, contrairement aux traitements antiparasitaires actuellement employés qui ne font que stériliser ces derniers. Aussi les *Wolbachia* sont-elles devenues une cible thérapeutique de choix contre les filarioses. Nous utilisons la filaire *Brugia malayi*, responsable de l'éléphantiasis humaine, car son cycle peut être maintenu au laboratoire, grâce à des moustiques, vecteurs de larves infectantes, et des gerbilles, hôtes permissifs de ce parasite humain. Afin d'avoir accès à notre modèle filaire, il nous est essentiel de posséder le cycle de reproduction de la filaire en animalerie. Pour maintenir *Brugia malayi* et couvrir nos besoins, nous avons établi que 600 gerbilles adultes seront euthanasiées sur une période de 5 ans, soit 10 par mois au maximum. Le recours aux gerbilles est inéluctable dans la mesure où le développement et la reproduction des filaires se font dans un hôte vertébré permissif spécifique, et que la culture *in vitro* est impossible. La présence de parasites dans la cavité péritonéale de la gerbille est indolore, et ne conduit à aucun des symptômes connus chez l'homme, car les gerbilles ont une durée de vie trop courte, et qu'elles sont euthanasiées au plus tard dès que les vers sont adultes et produisent assez de larves pour recommencer le cycle. Les larves, circulantes dans le sang, sont récoltées par prélèvement sanguin, ou lors de l'euthanasie de l'animal, et les moustiques sont nourris sur membrane, jamais sur la

gerbille elle-même. Des points limites sont définis pour éviter toute souffrance potentielle des animaux.

12439 L'hématopoïèse est le processus de production de toutes les cellules sanguines. Ces cellules proviennent de cellules souches/progéniteurs hématopoïétiques (CSPH) localisés dans la moelle osseuse chez l'adulte. L'hématopoïèse commence pendant le développement embryonnaire dans différents sites, dont le foie fœtal. Des études scientifiques indiquent que l'origine de certaines leucémies du petit enfant se trouve dans ces CSPH embryonnaires. Les leucémies pédiatriques sont encore mal connues et les mécanismes conduisant à leur développement sont peu étudiés. De plus, les traitements restent peu efficaces. Un travail récent chez un modèle de rongeur indique que certaines anomalies génétiques induisent des leucémies différentes selon qu'elles apparaissent dans des CSPH embryonnaires ou dans des CSPH adultes.

Dans notre laboratoire, nous nous intéressons aux processus de transformation qui conduisent une cellule souche à devenir une cellule leucémique. Nous étudions quelles cellules parmi les CSPH deviennent leucémiques, quel est l'impact d'un microenvironnement fœtal ou adulte sur cette transformation et comment les anomalies génétiques identifiées dans des cellules de patients peuvent transformer ces cellules.

Pour cette étude nous avons besoin de greffer les CSPH exprimant les anomalies génétiques étudiées à des modèles de rongeurs (souris), afin de confirmer leur transformation et d'étudier les mécanismes conduisant au développement leucémique. Les modèles animaux sont incontournables pour cette étude car ce sont les seuls qui permettent d'étudier le caractère transformé des CSPH étudiées. Les expériences de transplantation sont la référence du domaine, même si nous nous efforçons de réaliser le plus d'expériences in vitro.

Nous utiliserons des souris porteuses d'une combinaison de mutations induisant un phénotype d'immuno-déficience afin qu'elles ne rejettent pas les greffes des CSPH humaines, qui sont pour elles des cellules étrangères.

Nous étudierons le développement hématopoïétique obtenu à partir des CSPH jeunes (foie fœtal et sang de cordon) et adultes (sang mobilisé) génétiquement manipulées pour exprimer les anomalies génétiques impliquées dans le développement de la leucémie. Nous guetterons l'apparition d'une différenciation anormale, voire d'une hyper-prolifération, signe de développement leucémique. La question est : est-il possible de reproduire sur le modèle souris des leucémies proches de celles de l'enfant ? Nous vérifierons l'hypothèse selon laquelle les CSPH jeunes dans l'environnement du foie des souris nouveau-nés peuvent générer les premières étapes de certaines leucémies du petit enfant. Nous utiliserons des souris adultes receveurs pour contrôler notre hypothèse dans un environnement adulte. Les souris seront conditionnées par traitement myélosuppresseur (irradiation) avant la greffe des CSPH étudiées. Nous transplanterons des CSPH fœtales (foie fœtal d'embryon humain des CSPH d'enfant jeune (sang de cordon ombilical) et des CSPH d'adultes (sang mobilisé) afin de savoir si des CSPH fœtales, jeunes et adultes exprimant les mêmes anomalies génétiques provoquent la même leucémie ou une leucémie différente selon l'environnement (nouveau-né ou adulte) où les CSPH sont implantées.

Notre projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera un total de 500 souris, répartis en 210 nouveau-nés et 290 adultes. Ce nombre de souris est nécessaire pour les différents points abordés et pour avoir des données solides sur le plan statistique. Le nombre de souris pourrait diminuer si nous constatons que les receveurs nouveau-nés et adultes sont équivalents, ou si l'un des deux se révèle plus permissif au développement leucémique.

L'ensemble des procédures sera fait avec prémédication et sous anesthésie, si nécessaire, afin d'éviter la douleur et l'inconfort des animaux. Les expériences seront menées sur une durée maximale de 6 mois, durant laquelle seront réalisés des prélèvements de sang et de moelle osseuse. Les souris manipulées seront suivies quotidiennement après la transplantation des CSPH étudiées. La gestion de la douleur, du stress et de l'inconfort sera assurée par une surveillance importante, notamment par un vétérinaire. Les souris nouveau-nés seront séparés très peu de

temps de leur mère, le temps des transplantations. Les nids créés par les familles seront préservés le plus longtemps possible afin d'éviter le rejet des petits par les mères.

12440 La maladie de Parkinson est la plus fréquente des pathologies neurodégénératives, après la maladie d'Alzheimer (160 000 personnes en France).

Elle se caractérise par un syndrome moteur défini par une akinésie associée à un tremblement de repos, une rigidité musculaire et une instabilité posturale. L'akinésie se caractérise par un défaut d'initiation et d'exécution des mouvements volontaires, traduisant une lenteur d'exécution du mouvement. La rigidité musculaire parkinsonienne se traduit par une résistance aux mouvements passifs. Le tremblement de repos correspond à un mouvement lent et involontaire qui prédomine aux extrémités des membres. L'instabilité posturale est la conséquence de l'hypertonie fragilisant l'équilibre, la station verticale ainsi que la marche et entraîne de nombreuses chutes chez les parkinsoniens.

La caractéristique neuropathologique de la maladie de Parkinson est la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la Substance Noire. Les événements qui sous-tendent cette dégénérescence restent mal connus. Ceci rend le diagnostic de la maladie de Parkinson difficile, d'autant que l'apparition des symptômes ne se produit qu'après une perte neuronale importante. À l'heure actuelle, le traitement de la maladie est essentiellement symptomatique. La stratégie thérapeutique de référence vise à compenser le déficit dopaminergique par l'administration du précurseur de la dopamine, la L-DOPA, qui demeure la plus efficace. Mais si ce traitement améliore les symptômes moteurs dans un premier temps, son efficacité s'atténue à long terme et entraîne l'apparition d'effets secondaires très invalidants pour le patient, caractérisés notamment par des fluctuations motrices et des dyskinésies.

Les fluctuations motrices sont des variations de la fonction motrice au cours de la journée, tandis que les dyskinésies sont des mouvements anormaux involontaires (MAI). En effet, en début de maladie, la L-DOPA est efficace pendant plus de 4h mais cette efficacité diminue à mesure que la maladie progresse. Le phénomène dit « on-off » est une fluctuation motrice imprévisible et donc difficile à gérer par les patients. Les mouvements involontaires peuvent être divisés en deux types : Les dyskinésies de pic de dose : ce sont les plus courantes. Elles sont caractérisées par des mouvements de type choréique au niveau du tronc, de la tête, des membres et des muscles respiratoires. Ces mouvements anormaux apparaissent lors de l'atteinte de la concentration cérébrale maximale de L-DOPA. Les dyskinésies de fin de dose: ce sont des contractions involontaires, soutenues et douloureuses des muscles et en particulier de ceux des membres inférieurs. Ces contractions sont visibles lorsque les concentrations cérébrales en dopamine sont très faibles et disparaissent suite à l'administration d'une nouvelle dose de L-DOPA.

Le handicap sévère résultant des effets indésirables du traitement à la L-DOPA a conduit à la recherche de stratégies thérapeutiques visant à réduire ces troubles secondaires. Il apparaît que les efforts engagés pour mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à réduire ces troubles secondaires DOPA induits chez un patient Parkinsonien, doivent être poursuivis. Ces développements passent par la réalisation de tests effectués sur des modèles animaux aussi prédictifs que possible. En effet, il sera difficile ici de remplacer l'utilisation d'animaux par des modèles cellulaires in vitro afin de tester l'efficacité d'un candidat médicament sur l'aspect de la restauration comportementale. Un modèle expérimental chez le rat exprimant les MAI a donc été mis en place et est basé sur le modèle d'induction de la mort sélective des neurones dopaminergiques suite à l'injection intranigrale de 6-OHDA.

Deux semaines après la lésion dopaminergique, des tests comportementaux d'akinésie sont utilisés pour évaluer la sévérité d'atteinte des animaux. Puis un traitement à la L-DOPA sera réalisé pendant 3 semaines afin d'induire l'apparition des MAI. Les MAI seront alors quantifiés selon une échelle prenant en compte leur amplitude et leur durée pendant 1 minute toutes les 20 min et ce, pendant 3h. L'amantadine, connue pour ses propriétés anti-dyskinétiques en clinique, sera utilisée comme composé de référence.

Lors de la chirurgie ainsi que pendant tout le protocole expérimental des procédures de raffinements seront mises en place : l'injection de la toxine se réalise sous anesthésie chimique, avec un contrôle de la température corporelle et avec une couverture analgésique adaptée pour éviter toute souffrance aux rongeurs. En fin de chirurgie, les animaux sont placés dans une chambre chauffée jusqu'à leur réveil complet. De plus, un personnel qualifié évaluera cliniquement les animaux tous les jours et un certain nombre de mesures a été mis en place afin de minimiser toute souffrance et respecter le bien-être des animaux. Si le point limite est atteint au cours du protocole, l'animal concerné sera évalué cliniquement par au moins deux personnes qualifiées et sera euthanasié sans souffrance selon les normes éthiques en vigueur.

Nos données préalables réalisées avec des traitements antidyskinétiques de référence utilisés en clinique (amantadine) nous ont permis un calcul de la taille des cohortes d'animaux nécessaires aux tests d'efficacité d'une molécule candidate (réduction), permettant ainsi de limiter le nombre d'animaux utilisés sans pour autant diminuer la puissance de nos analyses.

Pour tester l'efficacité d'un candidat médicament sur une série expérimentale, incluant un groupe dyskinétique induit par la L-DOPA chez un rat rendu Parkinsonien et traité avec le véhicule (contrôle positif), 3 groupes tests (1 composé candidat testé à 3 doses), et un groupe incluant un composé de référence, le nombre total d'animaux pour une série expérimentale est de : 50 animaux, soit un total de 1250 animaux pour 25 séries expérimentales sur 5 ans.

12441 Le jeûne thérapeutique (interruption complète ou quasi-complète des apports de nourriture) et le régime cétogène (très riche en lipides, très pauvre en glucides avec apport protidique limité) sont de plus en plus étudiés pour leurs propriétés thérapeutiques chez l'Homme. Dans ces régimes, la source principale d'énergie de l'organisme n'est plus constituée par les glucides mais par les lipides.

D'un point de vue thérapeutique, le jeûne est reconnu pour le traitement de l'épilepsie depuis l'antiquité et le régime cétogène est utilisé pour la même indication depuis le début du XX^{ème} siècle. Il reste aujourd'hui une option thérapeutique importante pour la prise en charge des épilepsies pharmaco-résistantes, en particulier chez l'enfant. Plus récemment, il est apparu que ces approches pourraient également avoir des effets bénéfiques en neurologie, dans des pathologies aiguës (ischémie cérébrale, traumatisme crânien), des affections chroniques (maladie d'Alzheimer, sclérose en plaques) ou des cancers (glioblastome).

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est essentielle au bon fonctionnement du cerveau. En interagissant de manière très étroite avec les neurones et les cellules gliales, les vaisseaux sanguins cérébraux ont également un rôle important dans la régulation des processus inflammatoires, la production de nouveaux neurones ou les mécanismes de réparation tissulaire.

Notre projet a pour but d'étudier les conséquences, très peu connues aujourd'hui, du jeûne et du régime cétogène sur la BHE. Les adaptations (métaboliques, hormonales, comportementales, ...) qui découlent d'un changement de régime étant trop complexes pour être modélisées in vitro, ce projet nécessite l'utilisation d'animaux. Des rats seront soumis à un régime cétogène pendant 4 semaines ou à un jeûne de 1 à 3 jours puis euthanasiés afin de prélever leur cerveau. La mesure de la glycémie et de la cétonémie sera faite chez les rats vigiles sur une goutte de sang prélevée au stylo auto-piqueur, geste indolore et non stressant. Des tests comportementaux (non invasifs et indolores) seront réalisés sur les rats vigiles afin de vérifier l'impact de ces régimes sur l'activité locomotrice, l'anxiété et la mémoire des animaux. A l'issue des régimes, les organes seront prélevés après euthanasie sous anesthésie générale. Le cerveau sera utilisé pour isoler les cellules qui constituent la BHE et pour analyser comment ces régimes modifient l'expression des gènes dans ces cellules. Nous étudierons également l'impact de ces régimes sur le passage du sang vers le cerveau de différentes molécules (composés endogènes et médicaments) à travers la BHE.

Nous satisferons aux exigences (1) de réduction, en limitant strictement le nombre d'animaux à celui nécessaire à la validité statistique des résultats obtenus, en réalisant une expérience préliminaire sur un nombre limité d'animaux pour définir les conditions expérimentales les plus adaptées à l'étude et en utilisant les mêmes animaux pour différentes analyses (tests comportementaux et analyse de plusieurs organes sur les mêmes animaux), et (2) de raffinement,

en limitant au maximum le stress et la douleur des animaux au cours des expériences (hébergement dans des cages avec litière, suivi régulier du bien-être des animaux, définition de points limites au-delà desquels les animaux doivent être euthanasiés). En revanche, le remplacement des rongeurs par des invertébrés, très éloignés de l'Homme en terme de métabolisme, ou par des approches in silico, incapables de modéliser des processus aussi complexes que la régulation du métabolisme, ne permettrait pas de répondre aux questions posées et n'est donc pas envisageable pour ce projet.

Notre projet nécessite 2040 rats et est prévu pour durer 5 ans.

Ce projet sera la première étude détaillée des effets du jeûne et du régime cétogène sur la barrière hémato-encéphalique. Il devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes par lesquels ces régimes peuvent influencer favorablement l'apparition, l'évolution ou le traitement de pathologies du cerveau telles que l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer ou les tumeurs cérébrales.

12442 La prévalence des acouphènes augmente avec l'âge, atteignant un pic de près de 25% des individus dont l'âge est compris entre 60 et 69 ans. Les acouphènes dégradent considérablement la qualité de vie, et conduisent dans les cas les plus sévères à la dépression, voire au suicide. La gêne provoquée par les acouphènes peut être encore augmentée par l'hyperacousie, qui les accompagne dans environ 40% des cas. La forte prévalence des acouphènes et leur impact important sur la qualité de vie des sujets rend urgent la nécessité de développer des thérapies efficaces. Pour arriver à ce but, la compréhension des mécanismes des acouphènes est une condition sine qua none.

Dans ce contexte, notre projet vise à étudier la plasticité du cortex auditif induite par différents traitements (traumatisme auditif et environnement enrichi) dans la mesure où cette dernière serait impliquée dans la génération des acouphènes. Concrètement, nous étudierons les réponses neuronales (et ses modifications après traitement) enregistrées à partir de microélectrodes insérées dans le cortex auditif primaire du cobaye anesthésié.

Notre projet ne peut pas se passer de l'expérimentation animale car notre méthodologie consistant à enregistrer l'activité neuronale à un niveau microscopique est invasive. Or, il est indispensable d'avoir accès à ce type d'activité (microscopique) pour comprendre les déterminants neuronaux des acouphènes. Notre projet présente un certain nombre de raffinements, tout est mis en œuvre pour le bien-être animal aussi bien au niveau de l'hébergement (les animaux sont hébergés par paire) qu'au niveau des procédures expérimentales. Tous les moyens appropriés sont mis en œuvre pour minimiser ou éviter la souffrance des animaux au moyen de l'anesthésie et de l'analgésie. De plus, les électrodes utilisées dans notre projet permettent de collecter les réponses neuronales à partir de 16 sites distincts à travers toute l'épaisseur du cortex auditif de façon simultanée. Nos électrodes permettent donc un échantillonnage précis et en une seule fois d'une colonne corticale ce qui représente un raffinement technique et scientifique pour ce type d'étude. Le nombre estimé d'animaux dont nous aurons besoin dans le projet (n=150) a été calculé au plus juste afin de garantir que nos études pourront aboutir à des conclusions fondées statistiquement.

12443 Le diabète est un problème majeur de santé publique dans le monde. En France, 5% de la population est affectée par cette pathologie, soit plus de 3 millions de personnes. Les différentes formes de diabète se caractérisent par des taux élevés de glucose dans le sang. Dans le cas du diabète de type 1, cette hyperglycémie est causée par un défaut de production d'une hormone du pancréas, l'insuline. Dans le cas du diabète de type 2, l'insuline est produite mais son efficacité est amoindrie dans le tissu adipeux et musculaire, ce qui cause une résistance à l'insuline et est responsable de l'hyperglycémie.

Le diabète de type 1 résulte d'une activation anormale du système immunitaire qui est responsable de la destruction des cellules pancréatiques productrices d'insuline. De ce fait, le diabète de type 1 est considéré comme une maladie auto-immune. C'est une maladie mortelle si les patients ne peuvent compenser la perte de leur propre production d'insuline par des injections quotidiennes d'insuline synthétique. Les raisons du dérèglement du système immunitaire sont peu connues, mais regroupent probablement une combinaison de facteurs génétiques, infectieux et environnementaux.

Au début des années 90, une nouvelle catégorie de pathogènes a été associée à des maladies auto-immunes : ce sont les rétrovirus endogènes. Ils se sont intégrés dans le génome humain au cours des millions d'années d'évolution, et ils représentent actuellement environ 8% de notre génome. La protéine d'enveloppe du rétrovirus endogène humain (HERV) de la famille W, nommée HERV-W-Env, est impliquée dans le développement de la Sclérose en plaques (SEP) qui est aussi une maladie auto-immune. Cette protéine HERV-W-Env a également été détectée dans le sérum de patients atteints de diabète de type 1 et dans les lésions pancréatiques de patients diabétiques de type 1. HERV-W-Env pourrait donc être impliqué dans la survenue de certains cas de diabète.

Pour tester cette hypothèse, un modèle animal est nécessaire pour savoir si la protéine d'enveloppe du rétrovirus endogène HERV-W (nommée HERV-W-Env) peut entraîner le développement d'une autoimmunité et d'un diabète de type 1. Les souris NOD/ShiLtJ sont un modèle particulièrement adapté à l'étude du diabète de type 1 car elles développent spontanément cette pathologie. L'objectif de cette étude est de savoir si l'expression de la protéine HERV-W-Env peut accélérer l'apparition du diabète chez les souris NOD/ShiLtJ.

Dans le cadre du respect des 3R pour cette étude sur le diabète, le « remplacement » a été permis grâce à des études préliminaires confirmant l'implication de HERV-W-Env dans le dysfonctionnement des cellules pancréatiques *in vitro*. La « réduction » du nombre d'animaux est possible en réalisant les expériences de manière successive et non parallèle dans le but d'ajuster les protocoles en fonction des résultats précédents. Il est prévu d'utiliser 80 souris dans ce projet prévu pour durer au maximum 2 ans. Des personnes qualifiées seront en charge d'apporter les soins adaptés aux animaux et veilleront à leur bien-être afin d'assurer le « raffinement ». En particulier, ces personnes seront attentives aux symptômes potentiellement associés à l'expression de HERV-W-Env chez les souris NOD/ShiLtJ, à savoir, la survenue d'un diabète. Des points limites précoces et spécifiques au diabète ont été définis. Les animaux font l'objet d'un suivi individuel régulier (glycémie, poids, comportement) et des points limites sont associés à ces paramètres. Le protocole sera interrompu dès l'atteinte d'un de ces points limites. De plus, une combinaison d'enrichissements variés est utilisée en alternance tous les 15 jours pour favoriser le bien-être des souris (tunnel en carton, fibres de coton, plaques de cellulose, igloo PVC, briques de peuplier, lanières de papier).

12444 La reproduction chez les ovins et caprins est saisonnée. Chez les deux sexes, il existe au cours de l'année une période d'activité sexuelle maximale (saison sexuelle), généralement d'août à janvier, et une autre d'activité minimale ou de repos sexuel (contre-saison), de février à juillet. La durée de la saison sexuelle est très variable selon les races. La reproduction des brebis et des chèvres en contre-saison permet aux éleveurs d'étaler la production de lait ou de viande sur l'année, et ainsi de répondre à la demande des consommateurs.

Dans le cadre d'une mise à la reproduction en contre-saison (« désaisonnement »), l'insémination animale (IA) est pratiquée chez les petits ruminants quasi exclusivement après un traitement hormonal d'induction et de synchronisation des chaleurs et des ovulations (mimant les mécanismes endocriniens naturels). Cette méthode est aujourd'hui la plus efficace pour désaisonner la mise à la reproduction par une très bonne synchronisation des ovulations, de l'ordre de 12-24 h, permettant de pratiquer l'IA (par un technicien spécialisé) à un moment prédéterminé (sans nécessité pour l'éleveur de détecter les chaleurs des femelles). Le traitement utilisé en France (pour pratiquer l'IA chez les brebis et les chèvres) consiste à administrer à la femelle une éponge intra-vaginale imprégnée d'un progestagène de synthèse (acétate de flugestone) puis à faire une injection d'une hormone gonadotrope, appelée eCG (choriogonadotropine équine, sécrétée par le placenta de jument, PMSG en anglais).

L'utilisation répétée de l'eCG au cours de la vie de l'animal est cependant souvent suivie d'une diminution de la fertilité après IA, en raison de la mise en place d'une réaction immunitaire. En outre, le mode de production de cette hormone (extraite à partir du sang de jument gestante) pose de graves problèmes en termes de bien-être animal, obligeant les laboratoires pharmaceutiques vétérinaires à développer de nouvelles molécules (hormones gonadotropes de synthèse) en remplacement de l'utilisation d'eCG.

Il existe un fort enjeu autour du maintien de la pratique de l'IA pour la mise en œuvre des schémas de sélection génétique dans les filières de petits ruminants. Toutefois, dans le contexte socio-économique actuel, les pratiques de maîtrise de la reproduction doivent évoluer pour prendre en compte non seulement les objectifs d'efficacité et de rentabilité économique des producteurs, mais aussi des enjeux environnementaux et de sécurité alimentaire liés à la protection de la santé publique, ainsi que des enjeux liés au bien-être animal.

Des alternatives aux traitements hormonaux existent ou sont en développement, dans l'objectif de pouvoir pratiquer l'IA (traitements photopériodiques basés sur le contrôle de la durée d'éclairage journalière ; « effet mâle » comme pratique d'élevage basée sur les interactions sociales entre les mâles et les femelles). Cependant, les ovulations sont moins bien synchronisées après un « effet mâle » par exemple. Il est possible de pratiquer l'IA sur chaleurs naturelles, mais ces protocoles sont pour le moment très peu utilisés en France car ils nécessitent une détection préalable des chaleurs des femelles, et les IA doivent être réalisées sur plusieurs jours, ce qui est impossible avec l'organisation actuelle sur le terrain.

Afin d'apporter aux éleveurs et aux coopératives d'élevage et de sélection des solutions à moyen-terme (permettant une transition vers de nouvelles pratiques de gestion de la reproduction), il apparaît nécessaire de poursuivre le développement de molécules pharmaceutiques posant moins de problème en termes de bien-être animal et d'enjeux environnementaux, comme les molécules de synthèse à activité gonadotrope.

L'objectif du projet est de tester chez des brebis en contre-saison (avril-mai) 2 nouvelles hormones gonadotropes de synthèse en comparaison de l'hormone eCG (médicament vétérinaire commercial). Pour cela une première procédure de prises de sang sur 80 brebis testera la non cyclicité effective de ces femelles (dosage de progestérone). Les brebis qui seraient encore cyclées (environ 10 % au maximum) seront retirées de l'étude pour ne conserver que 72 brebis non-cyclées utilisées dans la seconde procédure de synchronisation et d'induction des ovulations : pose d'une éponge intra-vaginale de progestagène (médicament vétérinaire commercial), après 14 jours l'éponge est retirée et une injection intramusculaire unique d'hormone gonadotrope (nouvelle molécule ou eCG) est réalisée au moment du retrait. Pour cette procédure, 6 lots expérimentaux de 12 brebis seront constitués de façon à déterminer la dose efficace pour chacune des 2 nouvelles molécules de synthèse (2 doses seront testées par molécule), en comparaison avec une injection unique d'eCG à la dose couramment utilisée, ou avec une injection du diluant commercial (sans principe actif, lot témoin). La troisième procédure d'échographie ovarienne par voie transrectale sera réalisée sur les 72 brebis, une fois par jour pendant les 4 jours qui suivent le retrait d'éponge, de façon à repérer le moment de l'ovulation. Enfin, le nombre d'ovulations sera comptabilisé 7 jours après le retrait d'éponge lors d'une quatrième procédure d'endoscopie abdominale.

Lors de ce projet, la règle des 3R sera suivie ainsi :

- Remplacement : les tests d'efficacité d'hormones gonadotropes pour synchroniser et induire des ovulations ne peuvent être réalisés qu'avec l'utilisation d'animaux vivants. Aucune alternative n'existe.
- Réduction : Les données acquises sur l'utilisation de longue date de l'hormone commerciale eCG permettent de réduire le nombre de brebis à 12 par lot expérimental de façon à bien caractériser une différence d'effet si elle existe.
- Raffinement : Les prises de sang jugulaires, poses d'éponges intra-vaginales et injections intramusculaires seront réalisées par du personnel animalier expérimenté pour ce type de gestes. L'échographie ovarienne par voie transrectale sera réalisée par 2 vétérinaires spécialisés. L'endoscopie abdominale sera accompagnée de tranquillisants et d'anesthésiants et réalisée par une personne qualifiée à ce geste permettant de limiter au maximum le stress et la douleur. Ce projet sera réalisé en condition d'élevage classique respectant le comportement grégaire de cette espèce.

12445 L'anévrisme de l'aorte abdominale ou (AAA) est une pathologie caractérisée par une dilatation de 50% du diamètre de l'aorte abdominale par rapport à son diamètre initial. Il n'existe pas de traitements pouvant limiter l'évolution de la maladie hormis la chirurgie.

L'AAA présente souvent une forte agrégation plaquettaire (thrombus) qui provoque une fragilité progressive de la paroi entraînant une rupture de l'anévrisme. Cependant, les mécanismes qui régissent ce phénomène et l'implication des plaquettes dans cette pathologie demeurent inconnus.

Par conséquent, ce projet dont la durée est de 5 ans a pour but d'étudier le rôle des plaquettes dans l'anévrisme de l'aorte abdominale.

Afin de mener à bien ce projet, nous souhaitons étudier un total de 500 souris correspondant à 20 souris de différents génotypes (wild type (C57BL6) et des souris génétiquement modifiées pour les différents récepteurs plaquettaires. Ces dernières ne présentent pas de phénotype dommageable. Ajouté à cela le traitement des souris C57BL6 par des antiplaquettaires (aspirine, dabigatran...etc) pour le modèle d'induction de l'AAA qui sera appliqué chez la souris. Ce modèle consistera à induire un anévrisme par l'utilisation d'une enzyme, l'élastase au niveau de l'aorte abdominale, la durée de la chirurgie ne dépassera pas 20 minutes pour chaque souris et elle sera réalisée sous anesthésie et analgésie afin de maîtriser et de limiter au maximum la douleur post opératoire. De plus, nous procéderons à l'observation in vivo du recrutement des plaquettes au sein de l'aorte par une technique d'imagerie (microscopie intravitale) à différents stades de la pathologie (J3 et J7). Cette procédure dure environ 15 minutes pour chaque souris qui seront sous anesthésie et analgésie afin de maîtriser et de limiter au maximum la douleur. 14 jours après induction de l'anévrisme, l'euthanasie des souris est réalisé et l'aorte abdominale est prélevée afin d'établir différentes analyses.

Cet objectif ne peut être atteint que par des techniques in vivo, du fait de la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeux lors de l'anévrisme de l'aorte abdominale. De plus, ce projet sera complété par des approches in vitro respectant ainsi la règle des 3R telle que l'utilisation de cultures primaires qui réduit significativement le nombre de souris, la mise en place de points limites et un suivi régulier de l'état des animaux permettant ainsi de limiter la souffrance animale. Ces points limites se baseront sur les critères d'apparence et de comportement des animaux. Chaque critère correspond à une note dont le total déterminera le bon état de l'animal, l'utilisation d'analgésiques ou l'arrêt de la procédure.

Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables du développement de la pathologie et pourra donner lieu à de nouvelles perspectives thérapeutiques pouvant remplacer la chirurgie qui est lourde et invasive.

12446 En élevage porcin, les traitements antibiotiques sont fréquents afin d'enrayer les diarrhées colibacillaires apparaissant après le sevrage des animaux. L'existence de souches bactériennes multirésistantes réduit les options thérapeutiques. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles solutions thérapeutiques tout en réduisant les quantités d'antibiotiques utilisées en élevage. L'utilisation de nanoparticules ou de bactériocines (substances antimicrobiennes produites par des bactéries) figure parmi les nouvelles solutions thérapeutiques. L'objectif de ce projet est d'utiliser un modèle d'infection colibacillaire chez le porc pour comparer l'efficacité d'un antibiotique administré sous forme commerciale et de trois solutions thérapeutiques innovantes vis-à-vis de l'infection et de la colonisation par les *Escherichia coli* multi-résistants. Pour cela, une expérimentation sera conduite en animaleries protégées sur un total de 48 porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés, de 6 semaines d'âge. Six lots de 8 porcs seront utilisés, un lot non inoculé, un lot inoculé non traité et quatre lots traités (soit un antibiotique sous forme commerciale, soit ce même antibiotique sous forme de nanoparticules, soit des nanoparticules de bactériocine et diverses molécules). Le suivi, au moins quotidien, des animaux permettra d'observer et de comparer les éventuels symptômes. Des prélèvements de matières fécales seront collectés et analysés pour comparer l'excrétion de la souche résistante inoculée dans les différents lots. L'analyse statistique des résultats permettra d'évaluer l'intérêt des différentes formulations. Ces résultats ne peuvent être obtenus que par expérimentation sur l'espèce cible. Le protocole expérimental peut entraîner de la souffrance animale, car la souche d'*E. coli* utilisée possède

certaines facteurs de virulence : les animaux pourront présenter, dans la pire des situations, de la diarrhée, des vomissements et une déshydratation. En cas d'atteinte de points limites fixés, les porcs seront euthanasiés. Dans un but de réduction, compte tenu de notre expérience, le nombre d'animaux a été calculé de manière à obtenir des résultats significatifs en utilisant un minimum d'animaux par lot. Les inoculations et traitements seront faits par voie orale. Les animaux seront vus au moins une fois par jour ; ils seront élevés en groupe stable, disposeront d'objets manipulables, auront accès à de l'aliment et à de l'eau à volonté, et disposeront de lampes chauffantes ainsi que des plaques de couchage. Ils seront pesés chaque semaine. Leur température sera mesurée chaque jour, afin de surveiller l'évolution de leur état de santé. Afin de réduire le stress des animaux, les prélèvements seront collectés lors des prises de température. Enfin, des prélèvements d'organes seront effectués sur les animaux après leur euthanasie en fin d'expérimentation. Le remplacement n'est pas envisageable, les animaux utilisés étant nécessaires pour évaluer l'efficacité de solutions thérapeutiques innovantes pour la même espèce.

12447 Les rétrovirus endogènes humains (HERV) font partie de notre génome qu'ils ont intégré au cours de l'évolution. Ces reliques d'anciennes infections virales ayant eu lieu il y a plusieurs millions d'années représentent environ 8% de notre génome. Ces éléments font l'objet de divers processus visant à empêcher une expression qui pourrait être pathogène.

Cependant, il a été montré que des stress environnementaux, tels que des infections virales ou des toxines, pouvaient être à l'origine de la réactivation et de l'expression d'éléments des rétrovirus endogènes. Ils ont en particulier été impliqués dans la survenue de cancers et dans plusieurs maladies auto-immunes, comme la sclérose en plaques (SEP). Dans le cas de la SEP, la survenue de cette maladie a été associée à l'expression de la protéine d'enveloppe de la famille HERV-W (HERV-W-Env). Cette protéine a été décrite pour favoriser l'auto-immunité et exercer des effets pro-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de SEP.

En parallèle de ses effets dans la SEP, la protéine HERV-W-Env a également été impliquée dans d'autres pathologies auto-immunes telles que le diabète de type 1 (DT1) et la PIDC (polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique).

Afin de mieux comprendre les effets pathogènes de HERV-W-Env et de développer des approches thérapeutiques contre les maladies auto-immunes qui lui sont associées, l'étude des effets de l'expression de la protéine d'enveloppe HERV-W-Env dans des modèles murins est essentielle. Des souris transgéniques exprimant la protéine HERV-W-Env à faible niveau existent déjà. Ces souris transgéniques présentent un phénotype bénin (hyperglycémie) dont la pénétrance est variable. Il est donc important de savoir si un état inflammatoire peut favoriser l'expression de la protéine HERV-W-Env, comme cela a déjà été décrit pour d'autres HERV. Pour cette étude, l'état inflammatoire sera causé par l'injection de molécules décrites pour générer de l'inflammation, soit le LPS (Lipo Poly Saccharide), soit le TNFalpha (Tumeur Necrosis Factor).

Dans le cadre du respect des 3R pour cette étude, le « remplacement » a été permis grâce à des études *in vitro* ayant montré une augmentation de l'expression des protéines HERV en présence de stimuli pro-inflammatoires. La « réduction » du nombre d'animaux est possible en réalisant les expériences de manière successive et non parallèle dans le but d'ajuster les protocoles en fonction des résultats précédents. Au maximum, nous prévoyons d'utiliser 120 souris dans ce projet prévu pour durer 2 ans. Des personnes qualifiées seront en charge d'apporter les soins adaptés aux animaux et veilleront à leur bien-être afin d'assurer le « raffinement ». En particulier, ces personnes seront attentives aux symptômes potentiellement associés à l'expression de HERV-W-Env, à savoir, la survenue d'un diabète ou d'atteintes motrices. Des points limites précoces et spécifiques au diabète et aux atteintes motrices ont été définis. Les animaux font l'objet d'un suivi individuel régulier (glycémie, poids, score de motricité et comportement) et des points limites sont associés à ces paramètres. Le protocole sera interrompu dès l'atteinte d'un de ces points limites. De plus, une combinaison d'enrichissements variés est utilisée en alternance tous les 15 jours pour favoriser le bien-être des souris (tunnel en carton, fibres de coton, plaques de cellulose, igloo PVC, briques de peuplier, lanières de papier).

12448 L'épilepsie est une maladie neurologique très répandue dans le monde. Les crises d'épilepsie peuvent endommager le système nerveux central. A l'échelle du réseau neuronal, une crise traduit un déséquilibre de la balance régulant l'excitation et l'inhibition, en faveur de l'excitation. Il est donc important de maintenir un parfait équilibre excitateur et inhibiteur dans le système nerveux central et de comprendre de manière précise le fonctionnement cellulaire et moléculaire qui est en jeu lors des crises d'épilepsie.

Au début des années 2000, une mutation dans le gène codant pour une protéine appelée leucine-rich glioma-inactivated 1 (LGI1) est identifiée comme la cause d'une forme héréditaire d'épilepsie. La protéine LGI1 est exprimée dans le système nerveux central. Des études ont permis de montrer que LGI1 est une molécule essentielle au développement du système nerveux central et à la régulation de la balance entre l'excitation et l'inhibition dans le cerveau adulte. Cependant les approches actuelles ne permettent pas de comprendre de manière fine les fonctions de LGI1 dans la transmission synaptique (communication fine entre les neurones) dans un réseau neuronal mature (âge adulte).

En 2010, des anticorps dirigés contre la protéine LGI1 sont trouvés dans le sérum et/ou liquide céphalorachidien (LCR) de patients souffrants d'encéphalite limbique qui est une inflammation du système nerveux central. Ces patients, avec une encéphalite limbique, déclenchent de fréquentes crises d'épilepsie. Cette découverte d'anticorps produit par les patients constitue alors une alternative innovante dans l'étude du rôle de la protéine LGI1 dans la transmission synaptique. En effet, grâce à ces anticorps anti-LGI1 pathogènes, il est alors possible d'induire un blocage de la fonction de LGI1 lorsque le réseau neuronal est mature.

Le projet consiste à étudier le rôle de la protéine LGI1 dans la transmission synaptique. Pour cela, une étude électrophysiologique (étude des courants d'ions entrants et sortant de la cellule) et immunohistochimique (marquage coloré des protéines) sur tranches de cerveau de souris préalablement infusées avec des anticorps de patients sera réalisée. Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R. Les animaux recevront les soins et les analgésiques adaptés et seront élevés dans un environnement enrichi avec des petits cotons et papiers pour jouer et faire leur nids (Raffinement). Le nombre de souris (n=360) sera limité en nous appuyant sur le nombre d'animaux nécessaires par groupe pour avoir des résultats exploitables statiquement lors d'études semblables (avec l'infusion d'autres auto-anticorps) (Réduire) et en ayant réalisé des études préliminaires sur des cultures primaires de neurones (Remplacer). L'ensemble de ces expériences permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires des encéphalites auto-immunes et d'une façon plus générale les mécanismes physiopathologiques impliquant la protéine LGI1

12449 La nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) est l'une des molécules les plus importantes et intéressantes du corps humain. Elle est indispensable à plus de 500 réactions enzymatiques et joue un rôle clé dans la régulation de presque tous les processus biologiques.

Les travaux de recherche sur la biologie du NAD⁺ ont pris de l'ampleur ces dernières années, fournissant de nombreuses informations essentielles sur la pathogenèse des maladies associées à l'âge. En particulier, l'étude d'un intermédiaire clé de la production du NAD⁺, le nicotinamide mononucléotide (NMN) a montré que sa supplémentation dans l'alimentation a des effets préventifs et thérapeutiques, améliorant les conditions pathologiques associées à l'âge (obésité/diabète, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives). Cependant, la pharmacocinétique (devenir de la molécule après son administration) et l'évolution métabolique exacte de la NMN reste encore à définir précisément. De plus, des travaux très récents mettent en évidence qu'une partie importante de la NMN administrée par voie orale ne parvient pas aux tissus et organes sans être dégradée lors de son absorption intestinale et son passage par le foie (via la circulation porte).

Il apparaît donc essentiel d'étudier la capacité d'autres voies d'administrations (évitant le passage hépatique) à permettre une distribution tissulaire et cellulaire optimale de la NMN et du NAD⁺. Nous proposons d'administrer la NMN par voie intranasale car la muqueuse nasale et les poumons rendent l'absorption rapide et efficace étant donné leur richesse en capillaires sanguins et leur surface importante d'échange. L'administration intranasale sera comparée aux voies orale et intra-

péritonéale. Nous déterminerons la biodistribution tissulaire de la NMN, du NAD⁺ et de ses métabolites au cours du temps après une administration unique de NMN chez la souris.

Sept groupes d'animaux (souris C57Bl6/J) seront nécessaires à la réalisation de ce protocole. Deux groupes de souris recevant soit la NMN soit son excipient (sérum physiologique) par voie intrapéritonéale ; deux groupes par voie orale (NMN ou excipient) ; deux groupes par voie intranasale (NMN et excipient) et un groupe contrôle non traité. Quatre temps expérimentaux (30 min, 1h00, 5h00 et 24h00) seront testés afin de mesurer l'évolution des taux de NMN, NAD⁺ et des autres métabolites dans les différents organes au cours du temps, en fonction du mode d'administration. Bien que de sévérité légère et rapides (< 1min), les procédures d'administration seront effectuées sur des animaux anesthésiés afin de limiter le stress et l'inconfort.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées. Les animaux retourneront dans leurs cages avant euthanasie et prélèvements. Il y aura au maximum 5 animaux par cage et aucun animal ne sera isolé pour ne pas engendrer de stress excessif. L'établissement d'expérimentation a mis en place un enrichissement du milieu composé d'un igloo en polycarbonate et de fibres de calage en carton. La grande pratique des expérimentateurs permet de diminuer le temps de manipulation et donc le stress lors des procédures.

Réduire : Le nombre d'animaux total sera minimisé, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Nous avons calculé le nombre de sujets nécessaires en faisant une comparaison de moyenne. L'hypothèse de travail est que le traitement est considéré comme efficace si les concentrations mesurées de deux métabolites de la voie NAD⁺ (NAD⁺ et NMN) augmentent de 20% dans au moins deux organes cibles avec un risque alpha fixé à 5% et un risque beta (puissance) fixé à 90%. Chez la souris, la concentration de NAD⁺ hépatique est en moyenne de 900±135 nmole/g (Mori V, PlosOne, 2014). Le traitement est efficace si la concentration hépatique de NAD⁺ augmente de 20% soit 1080 nmole/g ; il nous faudra donc 10 animaux par groupe. L'ensemble du protocole nécessite 280 animaux.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront réduites au minimum et remplacées par des études in vitro sur cellules.

Les échantillons prélevés seront analysés afin de doser les différents métabolites de la voie du NAD⁺ dans le but d'établir un cinétique de leur biodistribution tissulaire en fonction du mode d'administration.

12450 Nous sommes de plus en plus confrontés à la problématique de santé publique liée à la résistance aux traitements spécifiques de pathologies. Cette résistance aux médicaments que l'on appelle Mononuclear Phagocyte System se traduit par la diminution de l'efficacité du principe actif pour soigner une maladie ou diminuer les symptômes chez le patient. Dans le but d'optimiser les effets thérapeutiques des médicaments utilisés en chimiothérapie, nous voulons mettre en évidence l'intérêt de l'encapsulation du médicament (ou Principe Actif PA) dans des nanomicelles ou nanoparticules. Celles-ci vont permettre de masquer la charge du principe actif et d'augmenter sa concentration intracellulaire afin d'assurer l'efficacité du traitement. Des études préliminaires ont montré la stabilité de la formulation et le relargage progressif du médicament in vitro. Afin de valider ces résultats, des études comportementales de ces nanovecteurs doivent être réalisées in vivo à l'aide d'outils d'imagerie moléculaire : la tomographie par émission de positons (TEP) ou la scintigraphie (TEMP). Nous allons ainsi mettre en évidence de manière quantitative les différences de biodistribution des principes actifs radiomarqués seuls et encapsulés dans des nanovecteurs (nanomicelles ou nanoparticules). Pour ces études, nous utiliserons un modèle de souris ayant subi une xénogreffe de cellules tumorales humaines induite en sous-cutanée.

Quatre anticancéreux ou principes actifs PA couramment utilisés en chimiothérapie et la curcumine seront radiomarqués (PA^{*}) ; visualisés in vivo en imagerie moléculaire soient seuls, soient encapsulés dans deux systèmes polymériques différents (PEG-PCL et PVP-PCL), soient intégrés dans des nanoparticules d'or (AuNP). Ces études nécessiteront l'utilisation de 5 groupes de 3 souris qui subiront chacun 4 injections des PA^{*} seuls, PA^{*} PEG-PCL, PA^{*} PVP-PCL, PA^{*} AuNP.

Ces études devront de manière très stricte suivre la règle des 3R :

Remplacement : le recours à l'expérimentation sur des animaux vivants est indispensable afin d'observer le comportement in vivo des nanovecteurs chargés en principes actifs. Le modèle murin est couramment utilisé en imagerie moléculaire des cancers. Les résultats in vitro ne peuvent suffire pour valider ces nouvelles formulations d'anti-cancéreux.

Réduction : L'utilisation des animaux sera réduite au maximum. Pour cela, pour chaque molécule, 3 souris induites seront impliquées dans quatre études en imagerie : 1. PA* seul ; 2. PA* PEG-PCL ; 3. PA* PVP-PCL ; 4. PA* AuNP. Les études seront faites sur des jours distincts et suffisamment espacés afin de respecter la décroissance radioactive et aussi le bien-être de l'animal. 3 souris suffisent pour les études statistiques en imagerie moléculaire.

Raffinement : les souris sont placées dans des conditions optimales (température, hygrométrie, cycle jour nuit 12h/12h, enrichissement des cages) au sein d'une animalerie agréée. Les animaux sont nourris ad libitum et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale sous isoflurane à 2%. Nous avons choisi des points limites clés qui permettent de prévenir une détérioration de l'état clinique général de l'animal dans le but d'éviter une quelconque souffrance.

12451 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un industriel pharmaceutique qui développe des composés thérapeutiques dans le domaine des troubles métaboliques. Au cours d'études cliniques menées précédemment par le client sur des patients diabétiques, le composé X a présenté des effets bénéfiques inattendus sur la fonction cardiovasculaire. Par ailleurs, lors d'une seconde étude clinique, le même composé a induit, chez le patient diabétique, des situations rares mais critiques d'acidocétose. Étonnamment, des données éparses indiquent que ces deux effets pourraient être liés par un mécanisme d'action unique. En effet, les effets protecteurs au niveau cardiaque du composé X pourraient provenir d'une utilisation accrue des corps cétoniques en tant que source énergétique par ce tissu, du fait d'une disponibilité augmentée de ces composés. Afin de vérifier cette hypothèse, la présente étude constitue une première approche visant ainsi à étudier l'impact d'une administration aiguë du composé X sur l'évolution des taux plasmatiques en corps cétoniques chez le rat normal (rat Sprague Dawley) et diabétique de type 1 (rat Sprague Dawley traités à la Streptozotocine).

Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de mieux caractériser les effets physiologiques et de mieux comprendre les mécanismes d'action de leur composé.

Le projet consistera en trois phases:

- Une phase de 7 jours d'acclimatation à l'animalerie après réception.
- Une phase de 7 jours permettant d'habituer les animaux à l'administration par voie orale. Sur un sous-groupe d'animaux (rats diabétiques), cette seconde phase consistera également à la mise en place d'un modèle de rat diabétique de type 1 par administration de Streptozotocine (STZ).
- Une phase expérimentale proprement dite. Celle-ci se limitera à une administration unique du composé X par voie orale chez des rats préalablement mis à jeun pendant 14h et à des prélèvements sanguins réalisés en bout de queue (10µl / prélèvement) à 0, 1h, 2h, 3h, 4h et 5h post-administration.

Pour cette étude un total de 96 rats seront nécessaires, divisés en 8 groupes expérimentaux.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- **Raffinement**: Le modèle animal de diabète qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de divers composés pharmaceutiques ou agroalimentaires sur le diabète. Il s'agit d'un modèle de rats rendus diabétique de type 1 via une administration unique de STZ. Cette administration induit une destruction partielle des cellules pancréatiques responsables de la sécrétion d'insuline. Ce modèle est ainsi un excellent modèle au regard de la pathologie humaine. Par ailleurs, le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Notamment, les prélèvements sanguins en série nécessaires aux dosages de corps cétoniques seront limités à un volume de 10 microlitres, soit un volume total de

60 microlitres par animal. Ceci est rendu possible par l'utilisation de bandelettes réactives de dosage des corps cétoniques plasmatiques. Un enrichissement du milieu de vie sera assuré par l'ajout de petites briquettes en bois. Enfin, bien que le protocole soit relativement peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés par groupe a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur les variations de taux de corps cétoniques.

12452 Le lupus systémique (LS) est une maladie auto-immune pouvant affecter divers organes. Des facteurs environnementaux et génétiques ont été mis en lien avec la maladie chez les LS adultes alors que les LS familiaux et à début pédiatrique peuvent être causés par une mutation d'un seul gène. Afin d'identifier des variants génétiques impliqués dans la maladie, une cohorte de patients atteints de LS pédiatrique a été constitué sur laquelle une analyse génétique à grande échelle a été réalisée. Des analyses bio-informatiques ont permis d'identifier chez plusieurs patients des mutations potentiellement causales notamment dans le gène X codant pour la protéine X. Elle joue un rôle clé dans la signalisation cellulaire notamment des lymphocytes B. Ces derniers sont notamment impliqués dans le développement du lupus.

Afin d'étudier le développement de la maladie, des souris transgéniques portant la même mutation que celle qui est retrouvée chez les patients ont été générées et ont permis de mettre en évidence de manière concrète que cette mutation induisait le développement d'un phénotype lupique chez la souris. Ce phénotype serait causé par une altération des cellules du système immunitaire. Afin de vérifier cette hypothèse, des greffes de moelle osseuse vont être réalisées sur des souris transgéniques à partir de moelle osseuse provenant de souris saines (WT). L'observation d'une réversion du phénotype lupique confirmera alors que la mutation induit un phénotype auto-immun par la dérégulation du système immunitaire. Inversement, des greffes de moelle osseuse vont être réalisées sur des souris WT à partir de moelle osseuse provenant de souris transgéniques ; l'observation d'un phénotype lupique confirmera l'impact de la mutation dans les cellules immunitaires. Comprendre spécifiquement le rôle intrinsèque de cette mutation permettrait d'envisager une greffe de moelle osseuse chez les patients avec cette mutation.

Une autre option envisagée pour les patients serait l'utilisation de la thérapie génique à partir de leurs propres cellules de la moelle osseuse. Cette alternative est envisageable car il s'agit de mutation unique. Dans un premier temps, cette étude sera réalisée sur les modèles murins. Pour se faire, il est nécessaire de connaître le pourcentage de cellules saines (WT) permettant de reverser le phénotype lupique des souris transgéniques. Nous allons ainsi réaliser des chimères de moelle osseuse en utilisant différents ratios de cellules WT et transgéniques afin de savoir le nombre nécessaire de cellules WT permettant de reverser le phénotype observé.

Ce type de projet ne peut être mené sans utiliser d'animaux car le système immunitaire est extrêmement complexe avec une multitude de cellules constamment en mouvement et organisées en un réseau tridimensionnel impossible à reproduire in vitro. Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Le nombre de souris a été calculé afin que les résultats aient une valeur statistique malgré les variations entre les animaux, tout en évitant les mises à mort inutiles. Le nombre d'animaux est donc estimé à 96 souris sur 3 ans. Tout au long du projet, nous veillerons à ce que les conditions d'élevage, d'hébergement et de soins soient les plus adaptées. Par ailleurs, les procédures utilisées dans ce projet n'occasionnent qu'une douleur et une angoisse minimales pour les animaux. Toutefois, afin de minimiser la douleur de l'animal, les animaux seront anesthésiés lors des procédures expérimentales. De plus, les animaux seront suivis tout au long de la procédure expérimentale. Un suivi utilisant un scoring nous permettra de surveiller le bien-être de l'animal. Un score élevé constituera alors un point limite.

12453 Nous nous intéressons au développement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui sont à l'origine des différentes cellules du sang (globules rouges, globules blancs et plaquettes). Et ce, au cours de la vie embryonnaire et fœtale, dans les conditions physiologiques ou pathologiques. Ces cellules sont capables à la fois de s'auto-renouveler (pour conserver un stock tout au long de la vie) et de se différencier pour donner toutes les populations de cellules du sang. A l'heure actuelle, peu de choses sont connues sur les régulateurs de l'amplification et de l'auto-renouvellement des CSH au cours du développement embryonnaire et de la vie périnatale chez l'homme. Or il est de plus en plus admis que grand nombre de pathologies et de cancers pédiatriques prennent leur origine au cours de la vie embryonnaire, et qu'une connaissance approfondie du développement normal pré- et post-natal des CSH est indispensable pour étudier le processus de formation des tumeurs.

Notre projet vise à étudier les mécanismes de régulation de l'amplification des CSH au cours du développement embryonnaire, et à déterminer si leur dérégulation pourrait aboutir à des pathologies sanguines pédiatriques. Nous nous intéressons particulièrement à la maladie de Fanconi (FA), qui est une affection génétique rare due à des mutations des gènes FANC impliqués dans la réparation de l'ADN. Cette maladie se caractérise par un très fort déficit, voire une absence en cellules sanguines dans la moelle des enfants FA, qui ont également une probabilité fortement accrue de développer une leucémie (cancer du sang). Notre projet, d'une durée de 3 ans (1110 souris), s'articule autour de 2 axes et doit permettre à terme une meilleure compréhension de l'origine du processus de développement des leucémies, question fondamentale que se posent aussi bien les pédiatres spécialistes des maladies du sang que les familles de patients.

Tout d'abord, nous souhaitons caractériser les propriétés moléculaires et fonctionnelles d'une population de CSH humaines au cours du développement, dans le foie et la moelle fœtale ainsi que dans la moelle pédiatrique au cours du développement normal. Cette analyse fonctionnelle fera appel à des greffes chez des souris qui n'ont pas de système immunitaire (souris immunodéficientes). Nous utiliserons cette lignée de souris car elle présente l'avantage de ne pas rejeter la greffe de cellules humaines et de supporter le développement d'un système sanguin humain à partir des CSH injectées. La procédure consistera à injecter par voie intraveineuse sous anesthésie gazeuse les CSH humaines (issues de foie ou de moelle fœtale ou de moelle pédiatrique) et à suivre la prise de greffe par prélèvement sanguin sur souris éveillées 6 et 16 semaines après l'injection. Cette procédure concernera 162 souris immunodéficientes et durera au maximum 20 semaines, au bout desquelles toutes les souris seront euthanasiées.

La seconde partie du projet nous permettra d'aborder le versant pathologique grâce à des modèles de souris transgéniques ne présentant pas de phénotype dommageable. Nous étudierons alors si l'expression d'un gène connu pour son rôle dans le contrôle de la mort cellulaire permet de restaurer le développement des cellules sanguines lorsqu'il est exprimé dans une souris déficiente pour un gène FANC (souris présentant un déficit profond en CSH très tôt au cours du développement embryonnaire, sans que cela ait un impact négatif sur le bien-être animal). Cette analyse impliquera d'une part des greffes de CSH de souris transgéniques à des souris normales (injection intraveineuse sous anesthésie gazeuse ; prélèvement sanguin sur souris éveillées 6 et 16 semaines après la greffe et euthanasie au plus tard à 20 semaines ; expériences nécessitant 900 souris). Nous confirmerons d'autre part cette restauration chez des souris transgéniques adultes chez lesquelles l'épuisement en CSH de la moelle osseuse sera provoqué par injection répétée d'un produit entraînant une inflammation chronique chez les souris. Le nombre de souris utilisées dans cet axe est évalué à 48 souris (8 cycles d'injections à partir de l'âge de 2-3 mois ; chaque cycle correspond à 2 injections intrapéritonéales hebdomadaires sur souris non anesthésiées pendant un mois suivi d'un mois de repos, prélèvement sanguin 2 fois par mois et euthanasie au plus tard à l'âge de 20 mois).

Tous les protocoles ont été pensés en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner ». Lorsque cela était possible, nous avons en première intention réalisé des tests fonctionnels *in vitro* pour déterminer les populations les plus intéressantes à greffer. Cependant, il n'existe à ce jour aucun moyen de remplacer les expériences *in vivo* de greffes, qui à l'heure actuelle représentent le seul modèle de référence reconnu par la communauté scientifique internationale. Ce modèle est le

seul qui permet de reproduire l'environnement complexe du développement des CSH. Nous avons par ailleurs réduit le nombre de souris à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats.

Une attention toute particulière sera également portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément de celle des expérimentateurs.

Et l'étude a été raffinée en développant un suivi rigoureux des souris tout au long des protocoles, selon des grilles d'évaluation permettant d'évaluer le bien-être des animaux. Lorsqu'une souris atteint un point limite préalablement défini, elle sera euthanasiée (en raison de l'interférence avec les processus inflammatoire, aucune analgésie n'est envisageable).

12454 Les maladies rares congénitales concernent de plus en plus de patients adultes depuis que les progrès de la chirurgie pédiatrique permettent de réparer les malformations au cours des premières semaines de vie des enfants. Les modèles souris de ces pathologies ont déjà apporté une meilleure compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents aux malformations cardiaques. Notre projet consiste à poursuivre ces efforts en recherchant comment prévenir ces maladies congénitales. Nous nous focaliserons sur 2 pathologies : un syndrome développemental, le syndrome de Cornelia de Lange et une cardiomyopathie dilatée due à une laminopathie, toutes deux montrant des malformations cardiaques.

Les analyses échocardiographiques effectuées chez ces modèles murins nous permettront de mesurer l'impact des malformations sur la fonction du cœur et en particulier selon les modèles murins étudiés dans la fonction des valves. Ces malformations n'ont néanmoins que peu d'impact sur la souris de laboratoire n'ayant pas de demande cardiaque élevée. Chez des patients, beaucoup de ces malformations ont pu et peuvent se révéler subitement au cours d'un effort intense, une situation très différente de celle des souris. Nos modèles de souris permettront donc de comprendre les pathologies sans affecter la qualité de vie des animaux.

Le phénotype des souris n'est donc pas dommageable, les souris ne développent pas non plus d'effet secondaire du type athérosclérose, et leur espérance de vie n'en est pas affectée. Les animaux seront anesthésiés par l'intermédiaire d'un gaz anesthésiant de type isoflurane, pour une analyse pouvant durer jusqu'à 1 heure. Le gel utilisé lors de l'analyse échographique sera préalablement réchauffé et maintenu à température, afin que cela n'impacte pas sur la température corporelle de la souris.

Le projet d'analyse échographique se fera dans le respect de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer). Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. Malgré les stratégies de remplacement mises en place dans le projet, ces dernières ne peuvent pas remplacer l'organisme entier en raison de l'isolement des cellules du contexte physiologique. Pour leur bien-être, nous respecterons la réglementation européenne concernant la densité d'animaux par cage (5 par cage). Dans la mesure du possible, les souris seront plusieurs par cage afin de respecter leur instinct grégaire. Leur milieu sera enrichi par du Sizzle Kraft chaque semaine pour leur permettre de se cacher de la lumière et de les occuper à confectionner leur nid, cela a pour but de réduire leur stress. Les animaux seront observés tous les jours, de leur arrivée à leur euthanasie. Des points limites sont définies pour éviter toute souffrances potentielles.

Nous limiterons le nombre de souris par groupe au minimum nécessaire à la significativité statistique, soit 6 par groupe, afin de réduire le nombre de souris dans ce projet. 8 groupes composeront notre étude, 5 d'entre eux auront chacun 6 souris sauvages comme groupe contrôle, donc 78 animaux composeront ce projet au total.

12455 Plusieurs études sur l'humain montrent que le stress n'est pas une simple réaction de stimulus-réponse, mais une interaction entre un individu et son environnement, impliquant une perception et une évaluation subjective des facteurs de stress, constituant ainsi un processus hautement personnalisé. Les caractéristiques héritées spécifiques, les premières expériences de la vie et, en

particulier, les prédispositions cognitives acquises, qui façonnent la personnalité humaine, rendent les individus plus ou moins sensibles aux effets des facteurs de stress.

Même si elles sont rares, les études scientifiques sur la relation entre la personnalité et la perception du stress chez les primates non humains apparaissent maintenant dans un large éventail de disciplines, notamment la psychologie, l'anthropologie, l'endocrinologie et la gestion des parcs zoologiques. Par exemple, l'évaluation de la personnalité des femelles babouins a révélé que les animaux désignés comme "solitaires" présentaient des niveaux élevés de glucocorticoïdes. Des études menées à la fois sur des macaques en captivité et des babouins sauvages ont montré l'existence d'un type de personnalité définie comme "hot reactor" (i.e. des animaux dont les comportements sont facilement perturbés par la nouveauté, qui ont du mal à distinguer les stimuli neutres des menaçants, et qui ne sont pas très bons dans les interactions sociales). Cette personnalité présente une ressemblance frappante avec le profil de « type A » chez l'homme, dans lequel les stimuli neutres sont interprétés de manière atypique comme menaçants. Après contrôle du rang hiérarchique, ces individus présentaient des taux élevés de glucocorticoïdes et un risque accru de maladies liées au stress.

D'un autre côté, la réduction du stress est l'un des objectifs principaux de tous les programmes de gestion du comportement des institutions scientifiques travaillant avec des animaux en raison de leurs effets négatifs sur le bien-être des animaux et de la validité des données scientifiques (Dir. 2010/63 / UE du Parlement européen et du Conseil).

La sélection des individus les plus adéquates pour participer à des procédures scientifiques relève directement des principes de raffinement et de réduction. L'objectif principal de ce travail est de mener une étude pilote visant à évaluer la force prédictive des évaluations de la personnalité sur la capacité des individus à gérer les situations potentiellement stressantes dans notre colonie de ouistitis communs (*Callithrix jacchus*). Dans la gestion au quotidien de notre colonie et lors de leur participation dans des études scientifiques peu invasives, ces animaux sont amenés à être manipulés par les vétérinaires du site (ex. bilan de santé annuelle avec contention manuelle). Les profils de personnalité pourraient-ils nous aider dans la sélection des individus les moins sensibles aux conditions stressantes de la vie en captivité dans les laboratoires ?

Pour répondre à cette question, nous allons, dans un premier temps, caractériser les profils de personnalité d'une partie des individus adultes de notre colonie de ouistitis communs (N = 13) à l'aide d'une méthodologie observationnelle du comportement non invasive. Nous collecterons des données sur la réponse physiologique de stress après une expérience stressante légère (à savoir les niveaux de cortisol dans le sang après 20 minutes d'isolement social) et nous la comparerons au niveau basal pour obtenir un indicateur de la réactivité physiologique de ces animaux. Nous comparerons ces valeurs entre des individus ayant des profils de personnalité différents afin de tester le pouvoir prédictif des profils de personnalité sur la capacité d'adaptation au stress des individus. D'après nos connaissances il n'existe pas, à ce moment, une méthode de remplacement pour étudier la personnalité de ces animaux.

La seule contrainte pour l'animal dans ce projet est la réalisation de deux prélèvements sanguins espacés de 20 minutes (sur les deux ans de durée du projet). Ces prélèvements se feront par un vétérinaire expert. Une anesthésie pour la seconde prise de sang sera envisagée comme mesure de raffinement en fonction de l'état de stress de l'individu afin de limiter l'inconfort de l'animal pendant l'acte.

12456 La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie est caractérisée sur un plan clinique principalement par un ralentissement moteur et des tremblements. Les symptômes ont été associés à une perte de neurones produisant la dopamine au niveau cérébral. Les traitements actuels visant à soulager ces symptômes ne sont pas optimaux. Le développement de nouveaux outils thérapeutiques est donc essentiel.

Notre étude est basée sur l'utilisation d'un modèle animal (souris) de la maladie de Parkinson permettant de reproduire les symptômes typiques de la maladie de Parkinson ainsi que la perte de

neurones dopaminergiques. Le principe repose sur l'injection intracérébrale d'un virus qui cible et altère spécifiquement les neurones.

Notre stratégie est d'induire la maladie de parkinson en effectuant des injections de virus dans le cerveau des souris et de tester l'effet d'un nouveau traitement sur le développement de cette maladie. Les animaux seront euthanasiés 2 mois après les chirurgies et des analyses histologiques seront faites afin de visualiser l'effet du traitement administré sur les neurones dopaminergiques.

Les approches mises en œuvre sont une chirurgie peu douloureuse et l'administration d'un traitement en chronique. Les bénéfices attendus sont une meilleure compréhension des effets d'un traitement expérimental chronique à différentes doses dans la maladie de parkinson.

Cette approche s'étale sur 10 semaines pour un traitement donné, elle pourra être reproduite au cours des 3 années de la durée du projet en respectant la règle des 3 R.

Dans le respect de la règle des 3 R (réduction, raffinement, remplacement) :

Le remplacement par des modèles in vitro actuels ne permettrait pas de répondre à notre question. Nous utiliserons au total 320 animaux. Ce nombre est suffisant pour obtenir une réponse statistique significative.

Pour le respect du R de raffiner, plusieurs critères sont pris en compte, tout le long des expériences, pour suivre le niveau d'inconfort ou de souffrance des animaux et décider, le cas échéant, de procéder à l'arrêt de l'expérience si le point limite est atteint. Les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'analgésiques les plus adaptés à chaque étape. Pour leur bien-être, limiter leur stress et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, un réchauffement, une nourriture adaptée et des traitements vétérinaires si nécessaire.

12457 Le contrôle de la biodisponibilité des nanoparticules est important pour leurs applications futures in vivo. Or toutes ces applications portent un danger dû à l'accumulation ou à la toxicité des nanoparticules. Il n'existe pas pour l'instant de stratégie permettant d'éliminer les nanoparticules de l'organisme une fois que leur rôle thérapeutique a été accompli. Le but de ce projet est de développer une stratégie visant à contrôler la biodisponibilité des nanoparticules et d'empêcher ainsi leur accumulation dans les organes. Nous proposons ainsi de profiter du caractère non-invasif et inerte des réactions chimiques dites « bioorthogonales » (une réaction chimique qui peut avoir lieu dans un milieu biologique complexe sans interférer avec les processus biochimiques natifs) pour cibler et éliminer des nanoparticules chez l'animal vivant. Nous proposons de fonctionnaliser convenablement des nanoparticules afin de permettre leur modification in vivo par une réaction chimique de type « click » qui conduira à leurs éliminations de l'organisme. Ce travail concernera trois types majeur de nanoparticules : (1) ultra-brillants organique (utilisés classiquement pour l'imagerie en biologie ou plateformes de transport des composées pharmacologiques) ; (2) des nanoparticules d'or (faibles toxicités ; l'imagerie chez l'animal vivant) ; (3) des nanoparticules d'oxyde de fer (diagnostique médical). La possibilité d'éliminer de l'organisme ces différents types de nanoparticules (avec des caractéristiques et des profils de biodistribution différents) permettrait d'évaluer le caractère robuste de la stratégie

Les réactions dites « bioorthogonales » sont des réactions chimiques qui peuvent avoir lieu dans un milieu biologique complexe sans interférer avec les processus biochimiques natifs. Nous proposons de profiter du caractère non-invasif et inerte de ces réactions pour cibler et éliminer des nanoparticules chez l'animal vivant. Le contrôle de la biodisponibilité des nanoparticules peut être important pour les applications futures des nanoparticules in vivo.

Pour étudier la possibilité d'éliminer des nanoparticules de l'organisme d'un être vivant, il est indispensable d'utiliser comme modèle un animal dans son ensemble et sa complexité. Le remplacement par des modèles alternatifs n'est pas possible.

Pour réduire le nombre d'animaux dans les analyses pilotes, nous allons utiliser des souris C57BL6NcrI non-modifiées génétiquement et provenant des analyses de la reproduction dans les pièces d'hébergement d'animalerie et destinées à l'euthanasie. La taille des groupes expérimentaux sera fixée à n=6 animaux/traitement (taille validée pour les autres analyses biochimiques ainsi que pour les études pharmacocinétiques) et pourra être réduit en fonction de la variabilité biologique observée.

Dans le cadre de raffinement, la toxicité des nanoparticules sera préalablement testée in vitro. Les nanoparticules seront administrées par injections intra-péritonéales. Afin d'éviter les souffrances, l'état de l'animal sera suivi après administration des composés. L'identification de symptômes de détresse entraînera la réduction de la durée du test ou l'élimination des nanoparticules concernées des tests. Les techniques standards de prélèvements permettront d'obtenir des échantillons sanguins et les tissus. Certains animaux seront perfusés au PFA en intracardiaque sous anesthésie à la xylazine/kétamine sans réveil. Au total, 251 animaux seront utilisés dans ce projet.

12458 Le but d'une hémostase chirurgicale est d'arrêter le saignement par un processus mécanique, physiologique, thermique ou chimique, voire une combinaison de ces approches, pour faciliter les processus naturels de coagulation. L'hémostase chirurgicale n'est pas seulement un contrôle temporaire du saignement durant l'intervention, mais une action plus durable dans le temps. Cela la rend complexe et très dépendante des modalités mêmes de l'intervention (localisation, instrumentation, pathologies). Dans le cas des interventions de neurochirurgies, l'hémostase réalisée doit prévenir tout saignement postopératoire dans l'espace intracrânien pour éviter toute détérioration ultérieure de l'état du patient.

La cautérisation électrique ou par laser est très efficace dans le contrôle du saignement, et sont les méthodes les plus employées lors des interventions de neurochirurgie. Toutefois, le fait de provoquer cette cautérisation locale, induit également une nécrose de certains tissus périphériques et rend les techniques de cautérisation monopolaire inapplicables à l'immédiate proximité ou à l'intérieur des méninges. Seule, l'utilisation limitée de cautérisation électrique bipolaire (les deux extrémités d'une pince fine représentant les deux électrodes actives entre lesquelles circule le courant) est acceptable à l'intérieur des méninges.

Les techniques classiques de cautérisation monopolaire peuvent cependant être utilisées lors de chirurgies du rachis pour arrêter le saignement dans les téguments et les tissus musculaires, mais peuvent parfois compromettre l'irrigation neuronale si elles affectent certains vaisseaux. De ces éléments, il ressort que le choix de la stratégie d'hémostase locale est très dépendant de la nature des interventions chirurgicales, leur localisation, la source des saignements et des pratiques chirurgicales.

Différents produits topiques ou dispositifs hémostatiques sont commercialisés mais beaucoup d'entre eux doivent être préparés extemporanément ou requièrent certaines compétences techniques pour être appliqués avec succès. Il y a un vrai besoin pour de nouveaux et plus puissants hémostatiques qui allient efficacité et innocuité pour les tissus.

Déjà testés avec succès lors d'une première étude sur un modèle de traumatisme cérébral chez le rat, l'objectif de ce projet est de vérifier et comparer en conditions réelles chez le porc, la capacité de deux produits à arrêter les saignements veineux et artériels lors d'interventions chirurgicales neurologiques et viscérales. Les deux solutions composées de petits peptides synthétiques, constitués d'acides aminés naturels, et d'eau (>97,5%), se présentent sous forme de seringue pré-remplie, sans préparation préalable et très facile d'utilisation. La solution de référence, commercialisée, est indiquée pour assurer l'hémostase de lésions hémorragiques suintantes des anastomoses vasculaires ou des organes solides en chirurgie viscérale et en endoscopie, mais n'est pas utilisée en neurochirurgie. Le nouvel agent hémostatique présente un mécanisme d'action similaire, il est validé en terme d'impact sur le saignement et d'un point de vue biocompatibilité.

Afin de limiter le nombre d'animaux impliqués à 12, l'ensemble des procédures chirurgicales sera effectué de manière à pouvoir tester les 2 produits sur chaque animal et nous stopperons les expériences dès l'obtention de résultats probants.

Le bien-être des animaux est respecté par une manipulation de sujets habitué à l'homme et la réalisation d'une anesthésie profonde dans les règles de l'art durant tout le temps opératoire. Les animaux sont euthanasiés sans risque de réveil dès la fin des actes chirurgicaux.

De plus, afin de réduire le recours à l'animal, nous réalisons post-mortem des prélèvements de tissus-organe-bloc multi tissulaire, à destination de recherche et d'enseignement.

12459 La peste équine est une maladie des équidés endémique en Afrique due à un orbivirus (AHSV) et transmise par des insectes piqueurs du genre Culicoides. AHSV a été à l'origine de foyers dans la péninsule ibérique à la fin des années 1980. La mortalité des chevaux peut atteindre 90% dans les foyers épidémiques. Il existe un vaccin vivant atténué par passages successifs sur des cultures cellulaires qui confère une protection partielle mais qui, parce que vivant, est strictement interdit dans les pays indemnes comme ceux de l'UE.

Nous développons actuellement des vaccins vivants contre les maladies virales animales basés sur l'inoculation de virus qualifiés de DISC (disabled infectious single cycle) produits en laboratoire. Les virus DISC infectent les cellules d'une façon similaire aux virus sauvages (c'est à dire les virus non modifiés par l'Homme) et leur font produire une grande quantité de protéines virales qui déclenchent la réponse immunitaire de l'hôte mais ils sont incapables de se répliquer dans les organismes auxquels ils ont été administrés et demeurent confinés aux quelques cellules initialement infectées. L'utilisation de virus DISC, construits à partir du génome du virus sauvage tout en le rendant incapable de se multiplier, présente un certain nombre d'avantages sur les méthodes vaccinales traditionnelles.

Notamment, à partir du moment où un virus a été identifié et que son génome est séquencé, le délai global de production des premiers virus DISC au laboratoire est extrêmement court (de quelques semaines à quelques mois) et permet de réagir efficacement aux épisodes d'émergence virale.

Dans un travail précédent, nous avons pu vérifier le caractère protecteur de deux vaccins de type DISC (monovalent et tétravalent) vis à vis de l'inoculation d'une souche d'AHSV chez des poneys. Ensuite, la durée de la présence d'anticorps circulants après une vaccination de poney avec un vaccin monovalent à virus DISC a déjà été déterminée. L'objectif du présent projet est de connaître chez le poney la durée de l'immunité humorale après une vaccination avec des vaccins polyvalents comportant différents virus DISC dirigés contre tous les sérotypes connus d'AHSV et de valider le fait qu'un vaccin "de mélange" est efficace aussi longtemps qu'un vaccin ne contenant qu'un seul virus immunogène.

Pour ceci nous envisageons d'utiliser un nombre maximal de 8 poneys pour obtenir deux groupes de trois. Tous seront vaccinés au début du projet et subiront une prise de sang hebdomadaire au début de l'étude puis toutes les deux semaines destinées à quantifier les anticorps circulants qui est une grandeur suffisamment prédictive de l'immunité anti-virale acquise pour éviter de réaliser des épreuves virales. Nous n'attendons pas de signes cliniques chez les animaux (à part une légère fièvre au moment de la vaccination, le cas échéant).

Pour ce genre d'études, le recours à l'animal de l'espèce cible du virus est une étape indispensable de validation. Les animaux sont hébergés dans des conditions similaires à celles des animaux des mêmes espèces en dehors des périodes de leur utilisation de loisir. Des friandises leur seront distribuées afin de les habituer à la manipulation par l'Homme. Nous utilisons un nombre aussi réduit que possible d'animaux et nous estimons pouvoir nous passer d'animaux témoins. Nous prévoyons toutefois deux animaux "de secours" de manière à compenser une possible, bien qu'improbable absence de réaction chez 1 à 2 animaux. Comme dans le travail précédent, les poneys seront vaccinés et pourront sortir du protocole après vérification de l'absence de virus circulant. Il sera donc possible de rendre ces animaux à leur propriétaire à l'issue du projet, après avoir réalisé les examens complémentaires ad hoc pour confirmer l'absence de virus OGM circulant et obtenu une autorisation des services chargés de la protection animale.

12460 Des bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent se développer, entre autres, au niveau du tube digestif lors de traitements antibiotiques chez l'Homme. L'apparition de ces résistances représente

un problème de santé publique. Il est alors nécessaire de développer une alternative aux traitements antibiotiques existants afin de traiter une pathologie d'origine bactérienne chez l'Homme tout en limitant l'apparition de résistances au niveau du tube digestif.

Le programme dans lequel est inclus ce projet propose d'associer des antibiotiques peu voire plus utilisés aujourd'hui chez l'Homme et de quantifier l'apparition de résistances lors de l'administration de ces antibiotiques chez le porc comme espèce modèle pour l'Homme.

Le projet en lui-même a trois objectifs:

- déterminer si les doses administrées permettent de reproduire chez le porc les concentrations plasmatiques en minocycline et en polymyxine retrouvées chez l'Homme,
- déterminer si cette association d'antibiotiques est à l'origine de l'apparition de bactéries résistantes au niveau du tube digestif,
- déterminer s'il peut y avoir un transfert de résistances entre les bactéries du tube digestif et des bactéries données par voie orale aux porcs.

Quinze porcelets seront utilisés pour ce projet.

Ils seront répartis en trois groupes de 5 porcs: un groupe ne recevant pas de traitement antibiotique (CT), un groupe recevant de la minocycline à faible dose et de la polymyxine (LD), un groupe recevant de la minocycline à forte dose et de la polymyxine (HD).

Les porcs des groupes LD et HD recevront 4 jours de traitement par voie intraveineuse et des prélèvements de sang seront réalisés pour déterminer les concentrations en antibiotiques retrouvées dans le sang. Après le traitement antibiotique, les quinze porcs ingéreront, après habituation et volontairement, une solution de bactéries préparée dans du sirop de cassis. Avant, pendant et après le traitement antibiotique, des prélèvements de fèces seront réalisés.

Il n'est pas possible de se passer d'animaux pour ce projet car le devenir d'un médicament dans un organisme (pharmacocinétique) n'est pas prévisible par des études *in vitro* compte-tenu de la complexité des mécanismes (mécanismes d'absorption, destruction par la flore intestinale, métabolisme hépatique, diffusion tissulaire, élimination rénale, ...). Il en est de même pour l'émergence de résistances au niveau du tube digestif. Cependant, il est prévu que l'évaluation de l'efficacité du traitement ne soit pas réalisée *in vivo* pour éviter l'utilisation d'un plus grand nombre d'animaux ou d'animaux malades.

Le nombre de porc par groupe nécessaire pour mener à bien ce projet a été déterminé par un calcul de puissance statistique à partir d'un pourcentage de bactéries résistantes retrouvées en élevage lors d'un traitement ou non de porcs avec une tétracycline.

Les porcs seront placés en boîtes individuelles afin d'éviter un transfert de bactéries résistantes d'un porc à l'autre. Les boîtes permettront cependant aux porcs de se sentir, s'entendre et se voir, et seront équipées de balles à mâcher suspendues à des chaînes en inox.

Pour limiter le stress des animaux, ils seront entraînés à la manipulation avant la réalisation du projet et du sirop de cassis leur sera donné comme "récompense" pour faciliter leur acceptation/apprentissage des manipulations.

Les porcs ayant reçu des antibiotiques ne possédant pas d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) vétérinaire et/ou des bactéries par voie orale, ils seront euthanasiés à la fin du projet.

12461 La dermatite touche 15 à 20% de la population dans les pays industrialisés et concerne 20% des maladies professionnelles (coiffeur, employé de la cimenterie, infirmière...). C'est une réaction inflammatoire cutanée résultant de l'exposition à des substances allergènes appelées haptènes. On recense actuellement jusqu'à 4000 molécules potentiellement allergisantes. Les seuls traitements disponibles sont les médicaments à base de corticostéroïdes dont on connaît les effets secondaires sur le long terme (effets diabétogènes, immuno-dépresseurs, effets sur le squelette, ulcère de l'estomac, inflammation du pancréas, infection du colon). Les voies de recherche actuelle portent sur le développement de nouveaux médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens.

Les modèles animaux de dermatite de contact ont permis d'éclaircir une partie des mécanismes physiopathologiques de la maladie. Dans ces modèles, la mesure de la réaction cutanée chez le

rat après application d'un agent allergisant est un modèle standard validé par la communauté scientifique.

Dans ce projet nous utiliserons ce modèle de réaction cutanée pour évaluer l'effet de traitement qui permet de réduire l'inflammation.

Remplacement : aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. En effet, les dermatites impliquent des interactions multiples et complexes. Bien qu'il soit possible de disséquer les événements individuels en détail avec des études in vitro, toutes les interactions impliquées dans la réponse inflammatoire in vivo ne sont pas possibles à simuler in vitro. Cependant les molécules testées dans ce projet ont fait l'objet d'une sélection sur des tests in vitro afin de choisir celles qui ont le plus fort potentielle dans l'indication thérapeutique testée.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesures sont mises en œuvre notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement adaptées (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis, l'induction ainsi que les mesures sont effectuées sous anesthésie gazeuse afin limiter le stress et l'angoisse des contentions.

Réduire : nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisé. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 10 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 1500 rats est envisagée.

12462 Le phosphore est un nutriment essentiel pour le porc, notamment pour son métabolisme osseux et énergétique. L'alimentation du porc, hors fraction minérale, ne contient pas assez de P pour couvrir ses besoins. Une supplémentation minérale, provenant majoritairement de roches phosphates, est pratiquée aujourd'hui mais, l'extraction de ces roches posent un double problème : un problème de durabilité d'abord, car les réserves de roches phosphates sont limitées ; un problème géopolitique ensuite car 70% des réserves mondiales sont détenues par seulement 2 pays. Dans ce contexte, un recours futur à des phosphates provenant des restes de carcasses non porcines et en particulier du squelette, non valorisés dans les abattoirs pourraient constituer une alternative pour la supplémentation minérale des aliments pour les porcs en croissance. Une limite est que la digestibilité du P d'origine osseuse, qui est une mesure de sa disponibilité pour l'animal, est moindre et plus variable que celle du P d'origine rocheuse, à moins que des traitements physico-chimiques puissent résoudre ce problème. Cette étude a pour objectif de mesurer la digestibilité de 3 phosphates provenant d'os de volailles et ayant été traités par différentes combinaisons de cuissons sous pression, dissolution dans de l'acide chlorhydrique ou broyage et de 2 phosphates d'origine rocheuse, sur des régimes alimentaires plus ou moins riches en fibres, la teneur en fibres des régimes étant un facteur de variation important de la digestibilité des phosphates. Les 5 sources de phosphates seront incluses dans des régimes enrichis en P qui seront comparés à un témoin non enrichi (6 modalités 'source de P'). Trois modalités de nature de fibres seront comparées (régimes non enrichi en fibres, régime enrichi en fibres solubles, régimes enrichi en fibres insolubles).

Le projet sera conduit en 3 étapes, consistant chacune aux tests des 6 modalités 'source de P' sur une modalité de 'nature des fibres de l'alimentation de base' parmi les 3 possibles. A chaque étape, les digestibilités totales des macroéléments (P, Ca, Mg, Na, K) seront mesurées sur des porcs en croissance selon un dispositif expérimental similaire. Chaque modalité sera testée sur 6 porcs, ce qui veut dire que chaque étape du projet impliquera 36 porcs en croissance et que le projet impliquera au total 108 porcs. Des animaux de remplacement seront également inclus, ce qui conduira à un total de 120 porcs. Les mesures de digestibilité seront conduites sur des porcs mâles entiers, qui seront adaptés aux régimes expérimentaux pendant 10 jours, puis dont le niveau d'ingestion et la production de fèces seront mesurés pendant 7 jours (procédure 1). Pendant les 10

jours d'adaptation, les porcs seront hébergés en cages (cage A ; dimensions : 77 cm x 125 cm) leur permettant de se mouvoir. Ensuite, pendant les 10 jours qui suivront (3 jours d'adaptation aux cages et 7 jours de mesure), les animaux seront placés en cages à digestibilité (cage B ; dimensions : 52 cm x 117 cm), limitant les mouvements des animaux afin de collecter quantitativement les fèces, non polluées par les urines pendant la dernière semaine.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est mesurer l'utilisation digestive des nutriments chez le porc et il n'existe pas de modèle mathématique ou in vitro permettant d'atteindre cet objectif. Réduction : le nombre d'animaux et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin de mesurer l'utilisation digestive des nutriments avec une précision de +/- 1% tout en limitant le nombre d'animaux. Raffinement : afin de limiter l'hébergement en cage à digestibilité limitant les mouvements de l'animal, les animaux seront d'abord hébergés dans des cages leur permettant de se retourner. Les cages seront placées de façon à permettre un contact visuel, sonore, olfactif et tactile entre les animaux. L'appétit (pesée individuelle des refus alimentaires), l'ingestion d'eau, le comportement des animaux (membres non verticaux en position debout) ainsi que l'état de la cage seront observés au moins deux fois par jour par le personnel des animaleries afin de détecter des blessures éventuelles, des diarrhées, des troubles respiratoires ou des troubles du transit digestif. Tout animal présentant l'un de ces troubles fera l'objet d'une prise en charge immédiate.

12463 Les salmonelles sont responsables, suivant leur hôte, de pathologies très différentes allant de la fièvre typhoïde à la gastroentérite. Les principales sources de contamination humaine dans les pays industrialisés sont les volailles contaminées. L'identification des animaux porteurs de Salmonella est donc une priorité en terme de sécurité sanitaire des aliments. Chez les volailles, la majorité des sérotypes de salmonelles (Typhimurium et Enteritidis) induisent un portage asymptomatique qui correspond à une infection systémique transitoire et à une persistance de la bactérie dans les caeca accompagnée d'une forte excrétion fécale sans trouble pour l'animal.

Les mécanismes à l'origine de ce portage sont très mal connus. Ils font intervenir de nombreux facteurs : bactériens (facteurs de virulence), de l'hôte (facteurs immunitaires), de la flore intestinale et de l'environnement. L'existence de recontaminations entre animaux est connue et nous avons montré récemment qu'elles jouaient un rôle capital dans l'établissement du portage.

Pour démontrer cela nous avons développé deux modèles d'infection des poussins par Salmonella : un modèle en isolateur où les recontaminations entre animaux sont très faibles et un modèle plus conventionnel, en cage, où les recontaminations entre animaux sont fortes. Les premiers résultats suggèrent que le portage de Salmonella est lié à la présence d'animaux super-excréteurs qui recontaminent les autres animaux plus résistants à une première infection.

L'objectif de ce projet est d'identifier les cellules infectées chez le poussin par ces bactéries, afin de caractériser les processus infectieux et mettre en évidence d'éventuels foyers de persistance. Nous inoculerons des souches fluorescentes sauvages, partiellement ou totalement délétées des facteurs d'invasion connus à ce jour ou qui seront identifiés. Ces souches pourront être tracées grâce à leur fluorescence. Les taux de colonisation de différents organes seront contrôlés pour mettre en évidence une éventuelle différence entre nos souches. Des prélèvements de différents organes (rate, foie, aorte, vésicule biliaire, jabot, iléon, caecum) seront réalisés afin de caractériser différents types cellulaires, visualisées en cytométrie, microscopie confocale et immuno-marquage. L'invasion cellulaire par les bactéries fluorescentes sera analysée.

Pour l'ensemble du projet, 4065 animaux seront nécessaires. Les animaux seront inoculés généralement sur des temps courts (2 jours). Pour l'étude de la persistance dans certains organes, tels la vésicule biliaire, des infections de 5-6 semaines pourront être réalisées. Les premières expériences nous montrent que cet organe est fortement colonisé et semble être un foyer de persistance, pendant au moins 4 semaines.

Remplacement : avant passage sur animaux, les hypothèses seront préalablement testées sur des modèles in vitro, voir organoïdes. Toutefois, les études menées in vitro sur les interactions

bactéries-cellules demandent à être vérifiées et validées in vivo. Un « aller-retour » entre ces 2 approches nous semblent nécessaire.

Réduction : les précédentes études ont permis d'adapter et d'optimiser le nombre d'animaux utilisés en fonction des procédures et des analyses réalisées.

Raffinement : les animaux bénéficieront d'un enrichissement environnemental et matériel, des points limites ont été mis en place pour palier à d'éventuelles souffrances.

12464 Pour les animaux comme pour l'homme, l'alimentation permet d'assurer l'équilibre physiologique tant en termes de développement que de santé. Les protéines des aliments apportent des acides aminés qui serviront à la synthèse des protéines, à la synthèse de molécules à activité biologique et à la fourniture d'énergie. Afin de limiter la concurrence entre l'alimentation de l'homme et celle des animaux, notamment pour les sources de protéines, la valorisation de sources de protéines non valorisables pour l'alimentation humaine peut être une solution pour une alimentation durable. Toutefois, ces sources de protéines demandent à être étudiées pour déterminer si elles répondent aux besoins nutritionnels des animaux et leurs effets sur le métabolisme, la physiologie et la santé. Le projet a pour objectif de déterminer la biodisponibilité des acides aminés d'un hydrolysate de protéines de plumes. La biodisponibilité des acides aminés sera déterminée en analysant la vitesse d'apparition dans le sang circulant des acides aminés issus de la digestion et de l'absorption d'un repas d'épreuve. Le projet sera réalisé sur 6 porcs miniatures adultes et 6 porcs en croissance munis d'un cathéter jugulaire, posé par voie chirurgicale et sous anesthésie générale, permettant de réaliser sans douleur et stress pour l'animal des prélèvements sanguins fréquents et répétés permettant de suivre l'apparition dans le sang des acides aminés du repas (Raffinement). La durée de l'essai sera de 5 semaines au total incluant la pose du cathéter et la phase de récupération/adaptation de 2 semaines suivies de 3 semaines de repas d'épreuve. Deux aliments seront formulés pour intégrer uniquement une source de protéines, l'hydrolysate de protéine de plumes avec ou sans acides aminés libres de synthèse pour équilibrer l'apport total en acides aminés par rapport aux besoins nutritionnels des porcs. Ces 2 aliments seront distribués successivement à chaque porc sous forme de repas d'épreuve. Ceci consiste à proposer au porc l'aliment sous forme d'un repas de petite taille et de réaliser une fois ce repas ingéré une cinétique de prélèvements de sang pendant 4 heures après le repas (environ 15 prélèvements de 4 ml de sang) à raison de 2 repas d'épreuve par semaine pour chaque porc (6 repas d'épreuve au total : 3 par aliment). Le sang prélevé permettra ensuite le dosage des acides aminés et d'autres métabolites et hormones.

Le porc miniature et le porc conventionnel sont utilisés dans ce projet pour comparer 2 types d'animaux de statut métabolique et physiologique différents : le premier pour pouvoir travailler sur un animal adulte de taille raisonnable par rapport à un porc conventionnel, et le second comme animal en pleine croissance.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : l'utilisation d'animaux vivants dans ce projet ne peut être remplacée par des approches cellulaires dans la mesure où il s'agit de mesurer la biodisponibilité de nutriments après ingestion d'un repas et que la biodisponibilité résulte de nombreux processus biologiques comme l'ingestion, la digestion et les régulations métaboliques qui ne peuvent être reproduites par des modèles cellulaires. Réduction : chaque porc est son propre témoin car il se verra proposé successivement les 2 aliments à 3 reprises. Ce dispositif dit en carré latin permet de gérer la variabilité entre animaux en travaillant sur un effectif limité d'animaux. Raffinement : la pose d'un cathéter sous anesthésie générale permet de réaliser des prises de sang sans stress ni douleur pour les animaux.

Les porcs seront euthanasiés à la fin de l'essai.

12465 La dystrophie myotonique de Steinert ou de type I (DM1) est une maladie génétique dominante qui se manifeste par une faiblesse musculaire, des troubles cardiaques, respiratoires et oculaire de type cataracte. L'évolution de la maladie est progressive et les manifestations sont variables d'un individu à l'autre. La forme la plus grave est la forme congénitale (CDM), les symptômes peuvent

apparaître dès la période intra-utérine par une réduction des mouvements fœtaux et d'un excès de liquide amniotique. A la naissance, l'enfant présente une faible tonicité musculaire généralisée, des troubles de la succion et de la déglutition et souvent des troubles respiratoires. La maladie est due à une anomalie du gène DMPK localisé sur le chromosome 19. La protéine produite possède une région avec un motif répété (motif CTG) de 5 à 50 fois chez un individu sain et cette répétition peut aller jusqu'à 1000 fois chez les patients. Plus la répétition du motif est élevée plus la maladie est sévère et peut conduire à la forme congénitale. La mortalité pour la forme congénitale représente 30% à 40% des patients.

Il s'agit d'étudier à l'aide d'un modèle génétique murin (souris Dmsxl) les atteintes respiratoires précoces associées à la maladie de Steinert. Ce modèle murin présente la répétition de motif CTG à plus de 1700. Les souris homozygotes à étudier sont notées Dmsxl et proviennent de croisements entre mâles et femelles hétérozygotes pour la répétition CTG. L'étude est menée à un jour de vie (J1, J0 est le jour de la naissance).

Sur le plan respiratoire, les études antérieures montrent que les souriceaux Dmsxl font des apnées à un jour de vie (J1) qui persistent à moindre mesure à J8-J9.

Généralement, les apnées néonatales quelqu'en soit la nature (obstructive/centrale et/ou mixte) provoquent des séquences d'hypoxie-réoxygénation qui sont considérées comme facteur de risque de désordres neurodéveloppementaux.

Notre objectif est de compléter le phénotype cardio-respiratoire de ces souriceaux et de caractériser la nature des apnées chez les souriceaux Dmsxl. Nous ferons cette étude uniquement sur les souriceaux à J1.

Evaluation avec une méthode non invasive (mesure sans restriction physique ni médicamenteuse respectant la physiologie de l'animal) :

- Mesure des variables respiratoires des souriceaux DMSXL pour quantifier les apnées des souris et les caractériser (centrale ou obstructive) par les déformations thoraco-abdominales accompagnant chaque apnée. La mesure est non invasive et la durée de la séparation maternelle n'excède pas une heure. Chaque souriceau est équipé d'un masque permettant la mesure du débit d'air instantané par pneumotachographie. Cette mesure est couplée à la mesure des déformations thoraco-abdominales au cours de la respiration grâce à l'utilisation d'un profilomètre laser. Une apnée centrale est caractérisée par une absence de débit ventilatoire et de mouvement thoraco-abdominal. Une apnée obstructive montre une absence de débit ventilatoire combinée à un mouvement thoraco-abdominal. Des points limites sont définies pour éviter toute souffrance potentielle.

Une seule procédure sera faite et le projet dure 6 mois. Nous ferons toute l'expérience en aveugle c'est à dire sans connaissance du génotype. Nous utiliserons l'ensemble de la portée à chaque fois. La répartition attendue dans chaque portée est de 25% de souriceaux Dmsxl, 50% de souriceaux hétérozygotes et 25% de souriceaux non mutés (WT). Nos souriceaux témoins WT et HET sont alors issus de la même portée que les souriceaux Dmsxl. Nous utiliserons le nombre de portées nécessaires pour atteindre 25 souriceaux Dmsxl. Sachant qu'une portée compte en moyenne 6-9 souriceaux, nous attendons à avoir 1 à 2 souriceaux DMSXL dans chaque portée. Il nous faudrait alors au maximum 25 portées et théoriquement 100 souriceaux selon les répartitions attendues.

Les effectifs prévus sont choisis compte tenu de nos expériences sur les variabilités attendues et pour avoir une puissance statistique satisfaisante (80%). Les variables mesurées sont comparées par un test de Student selon le génotype. Nous utiliserons 12 femelles hétérozygotes adultes génitrices. Les femelles seront réutilisées pour générer 2-3 portées. Les souris hétérozygotes survivent et se reproduisent sans difficulté. Les femelles gestantes sont isolées à quinze-seize jour de gestation. Leur cage est enrichie en papier absorbant pour la nidification. Les soins maternels ne sont pas perturbés le jour de la naissance car les souriceaux sont utilisés à J1. Les reproducteurs ne seront pas gardés en vie à la fin du projet qui dure 6 mois.

Toutes les données sont analysées en aveugle, les génotypes sont identifiés a posteriori de l'analyse statistique.

Les résultats obtenus permettent de compléter les résultats antérieurs et de préciser le rôle du gène DMPK dans le contexte physiologique de la maladie.

Les retombées de ce travail sont directement utiles en terme de prévention et d'implications thérapeutiques.

12466 Les myopathies inflammatoires (MI) sont un groupe de maladies qui sont caractérisées par la présence de faiblesse musculaire et de capacité réduite d'exercice, ce qui est associées à une baisse de la qualité de vie et à une mortalité accrue.

Les glucocorticoïdes (GC) à hautes doses constituent le traitement de première intention des patients atteints de MI, et il est important de noter qu'éthiquement, il n'est pas possible de ne pas en administrer, ces derniers étant le standard of care de première intention. Cependant, bien que ces médicaments améliorent la sévérité des symptômes de la maladie par le biais de mécanismes actuellement méconnus (effet thérapeutique), un traitement chronique provoque une myopathie cortisonée (effet iatrogène). Il est donc nécessaire d'améliorer la compréhension des mécanismes qui sous-tendent les effets thérapeutiques et iatrogènes des GC pour optimiser le soin des patients atteints de MI.

Nous avons précédemment montré qu'un modèle de souris basé sur une immunisation contre une protéine musculaire récapitulait la sévérité des signes et symptômes cliniques observés chez les patients atteints de MI, et représente donc un bon modèle murin de myopathie inflammatoire expérimentale (MIE). L'objectif du projet est de déterminer les mécanismes sous-jacents aux effets thérapeutiques et iatrogènes des GC chez les souris MIE.

REDUCTION: le nombre d'animaux utilisé dans ce projet est réduit au minimum sans compromettre les objectifs du projet. D'après notre expérience des groupes composés de 10 souris sont suffisants pour déterminer des effets thérapeutiques dans notre modèle de MIE avec une bonne puissance statistique. Deux cohortes contrôles et 2 cohortes MIE seront utilisées, ainsi ce projet utilisera un effectif de 40 souris. Sur la base de notre bibliographie, la question scientifique à laquelle répondra ce protocole n'a jamais été étudiée. Bien que seul le muscle squelettique soit concerné par nos procédures, les autres organes seront prélevés et conservés.

REMPACEMENT: Etant impossible actuellement de modéliser la complexité des MI au moyen d'un système cellulaire, le modèle MIE va permettre d'évaluer l'impact des mécanismes biologiques des GC sur les MI. Par la suite, et tant que possible, des études in vitro seront effectuées afin de limiter les expériences sur les animaux.

RAFFINEMENT: le raffinement des procédures par l'établissement de points limites permettra de réduire la souffrance. Nous avons montré que les souris MIE présentent une diminution de la force musculaire de 30 % mais cette perte n'affecte pas leurs capacités à se nourrir (poids corporel identique aux souris contrôles). De plus, les souris ne montrent pas de signes de souffrance. Les conditions de traitement aux GC en dehors du contexte de MIE n'induisent pas de signe de souffrance, et un tel traitement devrait même réduire la sévérité des symptômes de la myosite. Cependant, dans le cas où les animaux montreraient des signes de souffrances [4 critères parmi: respiration pénible, dos arrondi, distension abdominale, pelage rêche, ébouriffé, pâleur (yeux, oreilles, peau), isolement, position recroquevillée, démarche sur les phalanges distales, faciès contracté, yeux larmoyants, rachis proéminent, réticent à se déplacer, persistance du pli de peau, abdomen dur, abdomen mou, abdomen sombre, orifices souillés, perte de 15% du poids corporel / semaine] alors les expériences seront stoppées et après consultation du vétérinaire, les souris seront euthanasiées. L'euthanasie sera faite en suivant des méthodes appropriées et par des personnes compétentes. Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales en groupes sociaux. A partir de leur naissance, de la nourriture sera fournie au fond de la cage. Des carrés de coton sont mis à disposition des animaux afin de leur permettre de construire des nids. Pour minimiser le stress des injections, des seringues insuliniques seront utilisées. Les souris feront l'objet d'un suivi adapté et de soins vétérinaires au besoin.

12467 Depuis de nombreuses années, les antibiotiques sont utilisés chez l'homme et chez les animaux afin de traiter des pathologies infectieuses. En effet, des troubles digestifs associés à des cas de diarrhée et une forte mortalité sont fréquemment observés chez le porcelet juste après le sevrage. Le sevrage représente en effet une période charnière pour le porcelet du fait du stress social induit par la séparation avec la truie, le changement d'alimentation (liquide à solide) et de condition de logement. Cela explique donc que la période de post-sevrage est une période où les antibiotiques à visée sécurité digestive peuvent être fortement utilisés afin de prévenir ou contenir ces troubles digestifs.

Néanmoins, il s'est avéré que certaines molécules antibiotiques n'étaient plus efficaces pour traiter certaines pathologies digestives. Cette situation s'explique par le fait que certaines bactéries sont désormais capables d'échapper à l'action bactéricide de certains antibiotiques. Ce phénomène, appelé antibiorésistance, est d'autant plus préoccupant qu'il est retrouvé chez l'homme. On rappelle que les molécules antibiotiques utilisées en santé humaine sont les mêmes que celles utilisées en alimentation animale et que certaines bactéries résistantes retrouvées chez les animaux sont transmissibles à l'homme soit par contact, soit par ingestion d'aliments contaminés (cas des Salmonelles). Il est donc impératif de trouver des alternatives à ces antibiotiques afin de réduire la prévalence du phénomène d'antibiorésistance tout en maintenant les porcelets sevrés en bonne santé. Ainsi, les objectifs de ce projet consistent en l'évaluation de différentes solutions nutritionnelles permettant à la fois de réduire l'utilisation des antibiotiques et de garantir une bonne santé digestive chez le porcelet sevré. Ces stratégies devront également être utilisables sur le terrain d'un point de vue technico-économique.

Une procédure expérimentale sera mise en place pour étudier l'influence de divers facteurs sur la santé digestive et les performances de croissance des porcelets sevrés. Ces facteurs comprendront notamment la modulation de la composition des aliments distribués aux porcelets sevrés, mais aussi la mise en application de différentes techniques d'élevage liées à la distribution de l'aliment ou aux conditions environnementales. Ce projet sera réalisé chez le porcelet sevré âgé de 21 à 70 jours puisque le porc est l'espèce cible du projet. En effet, des spécificités d'espèce existent notamment sur les mécanismes de régulation physiologiques (endocrinologie, métabolisme) et sur les besoins nutritionnels des animaux. Ainsi, la complexité de ces paramètres et de leurs interactions ne permet pas d'utiliser des modèles alternatifs comme la modélisation ou les études in vitro.

La procédure expérimentale mise en œuvre dans ce projet inclura des possibilités d'alimentation avec des régimes carencés, des modifications des conditions environnementales (variation de la température et de l'humidité), des administrations individuelles per os de produits variés (bolus, microalgues, probiotiques...) autorisés ou non au niveau communautaire, des prises de sang ou des prélèvements de fèces. Ces modifications d'ambiance peuvent être nécessaires pour correspondre à des conditions estivales ou des conditions climatiques d'Asie ou d'Amérique du Sud afin que les connaissances soient transposables à ces zones géographiques. Les prélèvements de fèces ou de sang sont quant à eux utiles afin d'étudier plus en détail les réponses physiologiques à la nutrition.

Le projet aura une durée de 5 ans et inclura environ 5760 porcelets. Ainsi, environ 1152 porcelets pourront être impliqués chaque année dans ce projet, ce qui ne correspond qu'à environ un tiers des porcelets nés dans l'établissement utilisateur chaque année. De plus, environ 240 porcs pourront être euthanasiés dans la globalité du projet dans le cas où des prélèvements biologiques (organe, phalange...) post-mortem seront réalisés et environ 1440 porcelets pourront subir des prélèvements de fèces et/ou des prises de sang. Lorsque les animaux recevront des additifs sans agrément/autorisation, ces derniers seront écartés de la filière de consommation et seront donc euthanasiés sauf si une dérogation est obtenue. À la fin de chaque essai, les porcs rejoindront les salles d'engraissement de l'établissement utilisateur et seront élevés classiquement jusqu'à leur euthanasie avec les autres animaux de l'élevage.

Les porcs seront logés dans des aires de 4 individus de même sexe ou mixte, ce qui permet aux animaux d'avoir des interactions sociales. Les cases seront enrichies avec des balles suspendues. Des points limites sont définies. De plus, le nombre de tentatives de collectes d'échantillons

biologiques sera limité et la manipulation des animaux sera restreinte afin de réduire la souffrance ou le stress appliqué à ces animaux.

12468 Les veines variqueuses sont des veines superficielles dont les valvules anti-reflux sont devenues incompetentes, localisées principalement au niveau des membres inférieurs du fait de leur déclivité et sont permanentes et non résorbables. Elles peuvent impliquer des conséquences de gravités diverses : disgrâces esthétiques, douleurs et lourdeurs, crampe, fourmillements, fatigue, œdème, ulcère variqueux, phlébite profonde (10-23%), voire embolie pulmonaire.

Le seul traitement possible réside dans leur élimination ou leur atténuation, par différents moyens : les traitements dit chirurgicaux tels que le stripping (ligature et éveinage) ou apparentés comme la radiofréquence ou le laser endo-veineux et les traitements non chirurgicaux/mini-invasifs : par ablation ou par occlusion: laser exo-veineux, dispositif médical d'occlusion (ex : colle médicale ...). Tous ces traitements sont donc invasifs ou nécessitent l'utilisation de produits pouvant entraîner de graves complications en cas d'injection péri-vasculaire. Certaines propriétés sont évaluées in vitro mais l'injectabilité, les quantités nécessaires pour avoir l'effet souhaité et l'évolution du système variqueux ne peuvent être évaluées qu'en conditions réelles rendant ainsi le recours à un modèle in vivo indispensable. En raison de ses similitudes en termes d'anatomie nous avons choisi de travailler sur le modèle porcin. Ce modèle animal présente plusieurs avantages: -Utilisation de techniques d'imagerie et de matériels identiques à ceux utilisés chez l'Homme, - réalisation d'une fistule artério-veineuse de gros calibre, - Possibilité de tester plusieurs produits différents sur la cuisse d'un seul animal.

Cette étude, réalisée sur 8 porcs piétrains, propose dans un premier temps de recréer le modèle variqueux par la réalisation d'une fistule artério-veineuse au niveau de l'artère et la veine saphène ; et dans un second temps, de tester une nouvelle approche thérapeutique basée sur l'action mécanique de l'injection d'acide hyaluronique en péri-vasculaire. En effet, l'acide hyaluronique est une molécule naturellement présente dans le corps humain (peau, articulation, œil, ...), connue pour sa biocompatibilité et son faible pouvoir immunogène et également connue pour son pouvoir de compression (directement relié aux propriétés mécaniques du gel formulé). Le nombre d'animaux a été réduit au maximum, cette étude étant une preuve de concept, ce nombre est donc justifié.

Le projet de recherche sera mené par une équipe multidisciplinaire de spécialistes impliquant des chirurgiens, des phlébologues, des zootechniciens et des ingénieurs afin d'optimiser tous les gestes (chirurgie, échographie doppler...), et toutes les procédures invasives seront effectuées sous anesthésie générale avec utilisation d'analgésiques, dans un objectif de raffinement des procédures. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une nourriture adaptée, de l'eau de boisson à volonté et seront hébergés en groupe de 2 à 8 pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire le stress dans un box de 9m² avec enrichissement (cordes pendantes, chaines à mâcher, jouets et balles anti-morsure).

12469 La production de laine en Europe est devenue globalement non rentable, voire indésirable car le revenu de la laine est le plus souvent inférieur au coût de la tonte. En race de mouton Romane, la toison des adultes montre quelques aptitudes à muer annuellement. Mais un nombre très limité d'animaux muent complètement. A l'inverse, les moutons de la race Martinik Hair muent naturellement chaque année. Nous avons donc décidé de croiser ces deux races afin d'étudier le déterminisme génétique de ces événements de mue naturelle.

Après des croisements initiaux entre les Romanes et les Martinik Hair, la population croisée a été sélectionnée sur le phénotype de mue à l'âge de 7 mois. Pour cela chaque animal est observé et un croquis est réalisé pour déterminer les zones de son corps qui muent. Ce croquis est ensuite analysé par un logiciel d'image afin d'établir le pourcentage de mue de chaque animal. Les analyses quantitatives réalisées sur ce dispositif montrent que la mue est un caractère fortement héritable, indiquant qu'une sélection génétique est tout à fait possible sur ce caractère.

D'un point de vue scientifique, cette étude représente une première réalisation française et l'opportunité de mettre en évidence les mutations naturelles à l'origine de ce phénomène de mue. D'un point de vue agronomique, la mue naturelle des moutons offre une alternative à la tonte, source de stress pour l'animal, de travail fastidieux pour l'éleveur, et présente un intérêt économique intéressant pour les éleveurs.

L'analyse génétique des premières générations de sélection a permis de mettre en évidence deux régions du génome influençant la mue. Afin de réellement identifier la ou les mutations causales liées au phénotype de mue naturelle, nous avons besoin de prises de sang et d'étudier l'expression des gènes dans le tissu cible : la peau. En effet certains animaux muent complètement et ont une peau "nue", tandis que d'autres conservent leur toison et ont une peau "lainée". Afin d'étudier ce contraste, des prélèvements de sang et des deux types de peau seront réalisés sur 60 animaux.

La règle des 3R sera suivie ainsi :

- Remplacement : Les mesures de mue naturelle ne peuvent être réalisées qu'avec l'utilisation d'animaux vivants. Aucune alternative n'existe.

- Réduction : Lors d'un autre projet indépendant, nous avons exploré l'expression de certains gènes de la peau. Ainsi, la comparaison de l'expression des gènes de la peau de 30 individus qui muent et de 30 individus qui ne muent pas du tout nous permettra de bien caractériser une différence si elle existe.

- Raffinement : Les prises de sang jugulaires (une seule par animal) seront réalisées par du personnel animalier expérimenté pour ce type de prélèvement. Les biopsies cutanées (3 par animal, espacées de 15 jours) seront accompagnées de tranquillisants et d'anesthésiants et réalisées par une personne qualifiée à ce geste permettant de limiter au maximum le stress et la douleur. Cet essai sera réalisé en condition d'élevage classique respectant la grégarité de cette espèce.

12470 Lorsque nos barrières biologiques naturelles sont altérées (plaie cutanée, perforation intestinale, pneumopathie, etc...), des bactéries peuvent se retrouver dans la circulation sanguine. Une des principales familles de bactéries (appelées bactéries Gram-) libère des endotoxines (appelées lipopolysaccharides, ou LPS) reconnues par le système immunitaire de l'organisme infecté. De fortes quantités de LPS circulants (endotoxémie) mènent à une réponse inflammatoire excessive pouvant conduire au choc septique, caractérisé par de sérieuses anomalies circulatoires pouvant induire de graves défaillances multi-organes et provoquer la mort (30 à 50% des cas en unités de soins intensifs). L'incidence mondiale de ce syndrome est estimée à 18 millions de cas par an et aucun traitement réellement efficace du choc septique n'a été identifié à ce jour.

La protéine de transfert des phospholipides (PLTP) permet les échanges de phospholipides entre les différentes classes de lipoprotéines dans le sang. Elle est également capable de fixer les LPS et de les charger sur les lipoprotéines. Les lipoprotéines chargées en LPS sont par la suite captées par le foie, ce qui permet l'élimination des endotoxines par voie biliaire. La PLTP participe ainsi à l'augmentation de l'excrétion biliaire des LPS et exerce donc un effet protecteur anti-inflammatoire.

L'acide ursodésoxycholique (UDCA) est un acide biliaire indiqué dans le traitement des pathologies entraînant une occlusion des voies biliaires. Il possède des propriétés anti-inflammatoires, prévient la formation de calculs biliaires notamment en augmentant l'excrétion biliaire du cholestérol, mais aussi celle des LPS.

Le but de cette étude est de déterminer si la PLTP, en tant qu'acteur central du transport des LPS, contribue à l'activité anti-inflammatoire de l'UDCA. Nous utiliserons pour cela un modèle expérimental reconnu d'endotoxémie chez la souris, qui engendre des symptômes comparables à ceux observés lors d'une infection chez l'Homme. La réponse inflammatoire et le taux de survie suite à l'endotoxémie seront comparés entre des souris de type sauvage et des souris déficientes en PLTP (PLTP-KO), traitées ou non à l'UDCA. Notre démarche expérimentale répondra aux exigences de la règle des 3R.

- Remplacement : Le protocole vise à élucider un mécanisme complexe mettant en jeu l'interaction de plusieurs compartiments impliqués dans la détoxification et la clairance des LPS, ainsi que dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Ceci exclut l'utilisation de modèles in vitro ou de modèles

animaux inférieurs dont le métabolisme lipidique et le système immunitaire sont trop éloignés de celui des mammifères. Nous utiliserons dans ce projet le plus petit modèle de mammifère pour ce type d'expérimentation, la souris, en tirant parti de l'existence d'un modèle génétiquement modifié déficient en PLTP.

- Réduction : Le projet nécessite 12 souris par groupe pour les études de survie et 12 souris par groupe pour les études analytiques. Ce nombre est suffisant et nécessaire afin d'obtenir des résultats robustes. Ces études nécessiteront au total l'utilisation de 288 souris.

- Raffinement : Afin de réduire la souffrance des animaux, les procédures chirurgicales et celles d'euthanasie seront toutes réalisées sous anesthésie générale. Des points limites seront déterminés. Le milieu d'hébergement des animaux sera enrichi.

12471 Chez l'homme, des mutations du facteur de transcription Hnf1Beta sont responsables de pathologies rénales diverses et graves comme des anomalies du développement rénal et des anomalies de différenciation tubulaire (kystes).

Nous voulons étudier les mécanismes de formation des kystes glomérulaire rénaux liés à la déficience génétique de ce gène. Les glomérules rénaux filtrent le sang grâce à la pression exercée par le système cardiovasculaire. Des résultats suggèrent que chez des embryons déficients pour ce gène, la pression artérielle peut être à l'origine de l'expansion des kystes glomérulaires. Nous voulons vérifier si un abaissement de la tension artérielle peut limiter la formation de ces kystes. Pour cela nous voulons traiter des souris gestantes par gavage avec une drogue qui diminue la tension artérielle et nous prélèverons en post mortem les reins des embryons pour analyse.

L'utilisation d'un modèle animal est absolument nécessaire car il n'y a pas la possibilité de reproduire le développement glomérulaire rénal avec des systèmes de culture in vitro.

Le nombre de souris (femelles + embryons) sera de 140.

Afin de respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux sera réduit au minimum. Nos études précédentes ont montré que la validité de l'analyse statistique requiert un minimum de 15 animaux par génotype et par traitement (placebo vs drogue). C'est donc cette valeur que nous nous sommes fixée pour cette étude. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se feront avec une surveillance journalière. Les conditions d'élevage et d'hébergement seront effectuées dans le but d'augmenter autant que possible le bien-être des animaux (soins, enrichissement du milieu). Enfin des points limites ont été établis entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

Les résultats de ce projet, d'une durée de 2 ans, devraient nous permettre de comprendre l'impact de la diminution de la filtration glomérulaire sur la formation des kystes glomérulaires.

12472 La production de cellules sanguines, mécanisme appelé hématopoïèse, s'établit à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces cellules, très rares dans la moelle osseuse, ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier vers tous les types cellulaires sanguins. Les maladies hématologiques malignes (par exemple leucémies, néoplasmes myéloprolifératifs) prennent leur origine dans les dérèglements des CSH qui conduisent à la « dominance clonale » d'une CSH maligne sur les CSH normales.

Les études chez la souris ont apporté de nombreuses connaissances sur l'hématopoïèse normale et maligne. Ces études sont très souvent basées sur des greffes de cellules médullaires chez des animaux receveurs dont l'hématopoïèse a préalablement été supprimée par une irradiation du corps entier. Elles permettent de suivre le développement de CSH greffées dans l'organisme receveur car la CSH normale ou maligne s'implante peu sans irradiation. Cependant, l'irradiation corps entier induit un biais à la généralisation des résultats, les données récentes montrant que l'hématopoïèse est variable entre un receveur irradié ou non. Nous avons donc décidé de développer une technique permettant l'étude du développement d'une maladie hématologique maligne dans un organisme à partir d'un modèle le moins irradié possible pour s'approcher au plus près de ce qui survient chez l'Homme au début d'une telle pathologie. Les projets portant sur l'étude physiologique des facteurs

moléculaires et cellulaires influençant l'initiation et l'évolution d'une maladie hématopoïétique dans un organisme, il n'est pas possible d'obtenir les réponses en utilisant un modèle cellulaire.

La technique envisagée consiste à irradier localement le membre postérieur d'une souris pour créer un foyer à partir duquel les cellules médullaires greffées se propageront dans les organes non irradiés du receveur. L'utilisation de ce protocole avec des cellules normales montre, 3 mois après la greffe, des cellules donneuses en grand nombre dans les os de la patte irradiée et en faible nombre dans les organes non irradiés. Ce résultat montre que l'irradiation locale permet l'implantation durable d'un greffon chez la souris et son développement dans l'organisme non irradié.

Nous projetons d'appliquer cette technique à l'étude des néoplasmes myéloprolifératifs (NMP). Les NMP sont des maladies caractérisées par la prolifération dérégulée de CSH aboutissant à la production excessive de cellules sanguines. Elles sont causées par des mutations dont la plus fréquente (60% des cas) est JAK2V617F. Les souris exprimant cette mutation dans la CSH développent une pathologie semblable aux NMP de l'Homme suggérant que cette mutation est suffisante à induire la maladie. Cependant JAK2V617F est retrouvée chez des personnes saines suggérant que d'autres facteurs génétiques et/ou environnementaux concourent au développement de la maladie.

Pour montrer que la maladie peut se développer dans une souris localement irradiée, nous comparerons la greffe de cellules normales et JAK2V617F après une irradiation localisée. Nous utiliserons ce système pour analyser les modifications de l'environnement cellulaire et hormonal accompagnant le développement de la maladie dans la patte irradiée et dans la patte non irradiée. Nous déterminerons ensuite la cinétique de cette maladie et le rôle de la rate dans le développement de la maladie dans l'organisme. A plus long terme, une autre mutation et des facteurs de stress et de prédisposition ainsi que 3 inhibiteurs de voies de signalisation des médicaments seront testés pour étudier leur implication.

Dans un deuxième temps, nous envisageons d'étudier les troubles hématopoïétiques liés à l'irradiation à faible dose prise par les tissus sains lors d'une radiothérapie. En effet, les études statistiques ont montré une association entre l'exposition prolongée au rayonnement à faible dose et l'apparition de leucémies. En tenant compte de la littérature et de l'opportunité de calculer la dose intégrale prise par les tissus sains, nous envisageons d'étudier les troubles hématopoïétiques après une exposition à long terme à une irradiation faible dose chez la souris afin de mimer l'irradiation prise par les tissus sains pendant une radiothérapie chez l'homme.

Pour cette étude, nous avons retenu plusieurs modèles de rongeurs, élevés dans un établissement agréé. Le nombre d'animaux (2150) a été déterminé grâce aux expériences pilotes réalisées dans le cadre d'un précédent projet. Il correspond au minimum nécessaire pour assurer la validité statistique des expériences qui seront menées.

L'état de santé des animaux sera étroitement surveillé tout au long des expériences et évalué cliniquement afin de limiter leurs contraintes. L'application de critères d'arrêts des animaux hébergés en groupe nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés ou de décider d'une euthanasie.

12473 La glycogénose de type 1a est une maladie génétique rare caractérisée par une incapacité de l'organisme à produire du glucose (sucre) pour maintenir sa glycémie (taux de sucre dans le sang) entre 2 repas. La production de glucose est réalisée principalement par le foie et les reins. Ainsi, la glycogénose de type 1a se caractérise par des hypoglycémies sévères. A l'âge adulte, la plupart des patients développent aussi une maladie rénale. Des données de la littérature ont montré que le développement de cette pathologie rénale est très semblable à celui des patients diabétiques. La maladie rénale chronique est d'abord silencieuse puis peut être mise en évidence par la présence d'albumine et de lipocaline dans les urines. En progressant lentement, mais irréversiblement, elle évolue vers une insuffisance rénale. A l'exception d'un contrôle nutritionnel très strict limitant les hypoglycémies, il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour cette maladie chronique

rénale. La dialyse puis transplantation rénale sont les seules solutions lorsque l'insuffisance rénale est atteinte.

Le but de ce projet est donc de mieux comprendre les mécanismes menant à la perte de la fonction rénale et de tester des molécules à visée thérapeutique afin de prévenir ou ralentir le développement de cette pathologie rénale chez les patients atteints de glycogénose de type 1a. Ce projet sera réalisé grâce à l'obtention d'un modèle original de souris viables atteintes de glycogénose de type 1a en ciblant la maladie uniquement dans les reins, sans toucher à la production de glucose par le foie. Ces souris développent au cours du temps la pathologie rénale, avec l'apparition des premiers signes cliniques (microalbuminurie et lipocaline dans urine) dès 6 mois, mais en l'absence d'épisodes d'hypoglycémie. A plus long terme, des kystes rénaux apparaissent alors que la perte de la fonction rénale progresse de façon irréversible. Dans ce projet, nous constituerons une banque de reins obtenus à un stade avancé de la maladie rénale pour analyser les mécanismes de formation des kystes, et éventuellement de tumeurs rénales. En parallèle, nous proposons de tester différentes molécules à visée thérapeutiques chez des souris atteintes de glycogénose de type 1a pour prévenir l'évolution de la pathologie. Les traitements débiteront précocement avant l'apparition d'une microalbuminurie. Les souris seront traitées pendant 6 à 9 mois avec un suivi régulier de l'évolution de la maladie rénale par mesure de marqueurs biologiques dans le sang et les urines.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R :

Remplacement :

Cette étude est difficile à réaliser chez l'homme car le nombre de patients est très limité et la pathologie est progressive et évolue sur plusieurs années. Il est donc nécessaire de démontrer l'efficacité de ces traitements chez les souris atteintes de glycogénose de type 1a. Une approche en culture cellulaire nous permettra de valider les voies moléculaires identifiées chez la souris. Nous pourrons ensuite cibler ces voies moléculaires en cellules avant de proposer un traitement chez l'animal.

Réduction : Le nombre total d'animaux a été calculé au plus juste à partir de nos connaissances sur l'évolution de la pathologie dans ce modèle animal. Il est important de noter qu'une grande partie des analyses sera effectuée uniquement sur le cortex rénal qui représente environ 50-100 mg de tissu/rein. Cette contrainte explique le nombre de souris important pour constituer la banque de tissu afin de réaliser ensuite une analyse statistique. Les souris femelles transgéniques non utilisées dans ce projet seront utilisées pour la reproduction ou incluses dans un autre projet. Au total, ce projet nécessitera au maximum 268 souris sur une période de 5 ans.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les animaux seront élevés par groupe dans un environnement enrichi pour favoriser la nidation, avec accès libre à la nourriture et l'eau de boisson. Ils seront suivis quotidiennement et pesés régulièrement. La connaissance de l'évolution de cette maladie dans ce modèle animal a permis de définir des points limites à ne pas atteindre pour éviter le mal-être des animaux.

La présence d'albumine ou de lipocaline dans les urines est détectable à partir de 6 mois mais sans conséquence sur le bien-être animal (maladie silencieuse). L'apparition d'une insuffisance rénale (accumulation de déchets comme l'urée dans le sang) est tardive, entre 12 et 15 mois, et s'accompagne d'une perte de poids de l'animal. Le suivi du poids des souris et des marqueurs biologiques permettra de connaître régulièrement le stade d'évolution de la maladie des souris traitées et non traitées. Les molécules/médicaments seront ajoutées aux croquettes ou à l'eau de boisson afin d'éviter le gavage quotidien des animaux. Les souris seront euthanasiées si besoin en cas de mal-être ou à la fin du protocole selon les méthodes autorisées par la législation afin d'analyser les reins.

En conclusion, les expériences réalisées chez la souris devraient permettre de valider l'utilisation de ces médicaments dans le cadre du traitement de la maladie rénale qui se manifeste chez la majorité des patients adultes atteints de glycogénose de type 1a.

12474 Dans un contexte où la réduction de l'utilisation d'antibiotiques est autant une nécessité technique qu'une attente sociétale, l'usage d'huiles essentielles se développe rapidement en élevage. Or, peu de ces substances sont, à ce jour, inscrites dans le tableau des substances autorisées en traitement des animaux d'élevage dont les denrées sont destinées à la consommation humaine.

Aujourd'hui, de nombreuses huiles essentielles sont utilisées en élevage, avec ou le plus souvent sans vétérinaire, en automédication, sans traçabilité, sans ordonnance, ni respect de temps d'attente après traitement. Ces utilisations concernent autant les élevages en agriculture biologique que les élevages conventionnels. Les pratiques actuelles d'utilisation des huiles essentielles dans les élevages laitiers sont donc susceptibles de présenter un risque pour le consommateur en l'absence de données sur la présence ou l'absence de résidus dans le lait.

Afin de commencer à fournir aux vétérinaires les éléments qui permettront de sécuriser leurs prescriptions, restaurer la traçabilité et la sécurité du consommateur, il est urgent de mener des recherches de résidus de traitement à base d'huiles essentielles dans le lait des vaches laitières et d'évaluer si le respect d'un temps d'attente est nécessaire.

L'objectif de cette étude est d'apprécier le risque potentiel pour le consommateur en recherchant des résidus des principales associations d'huiles essentielles utilisées sur le terrain. Il s'agit d'une première étape dans la voie de la sécurisation de l'utilisation des huiles essentielles en élevage. Nous allons travailler avec 3 vaches laitières sur 3 périodes de 4 semaines réparties de mai 2019 à novembre 2020.

Nous veillerons au respect de la règle des 3R : réduire, raffiner, remplacer.

Le nombre minimum d'animaux nécessaires pour que les données soient exploitables a été évalué à 3. Les animaux seront maintenus dans un environnement adapté à leurs besoins. L'ingestion et la production de lait de chaque vache seront mesurées chaque jour. Les indicateurs de souffrances de l'animal telles que la baisse de l'ingestion ou la perte de production laitière seront observés et toute indication de mal-être des animaux conduirait à les sortir de l'expérimentation, en accord avec le vétérinaire. La partie du protocole pouvant entraîner de la souffrance chez les animaux est clairement identifiée. Il s'agit de la pose d'un cathéter pour permettre la réalisation des prélèvements sanguins sans avoir besoin de piquer l'animal. Cette pose de cathéter se fera sous anesthésie locale. Il n'y a pas de possibilité de remplacement des vaches laitières car les produits doivent être testés sur l'animal.

12475 L'obésité et ses complications représentent un problème de santé publique croissant dans notre société. Les études épidémiologiques et les recherches menées chez l'animal ont identifié l'obésité maternelle, le diabète gestationnel et l'alimentation maternelle déséquilibrée comme autant de facteurs de risque augmentant la vulnérabilité à l'obésité de la descendance. Afin de réduire ce risque, une stratégie de prévention consiste à prendre en charge les futures mamans pendant la grossesse. Ainsi des supplémentations orales en folates et en Fer sont recommandées par l'Organisation Mondiale de la Santé pour les femmes enceintes afin de prévenir les anomalies du tube neural, l'anémie maternelle, les petits poids de naissance ou encore les naissances avant terme.

Chez la femme, la tolérance et l'innocuité d'une molécule que nous appellerons molécule M, durant la grossesse ont été démontrées et les études cliniques montrent aussi que la supplémentation en cette molécule chez des patientes présentant un diabète gestationnel non contrôlé améliore l'équilibre glycémique et permet d'éviter l'insulinothérapie. Des études précédemment menées chez le rongeur montrent le bénéfice pour la descendance d'une supplémentation périnatale avec molécule M dans le cadre d'un diabète ou d'un syndrome métabolique gestationnel.

Une première étude pilote a consisté à étudier l'intérêt d'une supplémentation dans l'eau de boisson en molécule M administrée aux futures mères ayant une alimentation déséquilibrée (hypercalorique) sans pathologie métabolique déclarée pendant la période périnatale (conception, gestation, lactation) afin de déterminer s'il était possible de réduire la vulnérabilité à l'obésité de la descendance. Nous avons révélé un effet protecteur de la molécule M chez la descendance dont les mères avaient été supplémentées, par rapport aux descendants des mères non supplémentées.

Nous souhaitons à présent s'assurer de la reproductibilité de nos premiers résultats et compléter l'étude dans le but de vérifier la non toxicité de cette molécule en l'absence d'un déséquilibre nutritionnel maternel. Chez la descendance, nous étudierons les effets de la molécule M d'un point de vue neuro-développemental (altération/préservation des réseaux de neurones entre structures impliquées dans le comportement alimentaire) et métabolique (mesure du poids, de l'adiposité, régulation de la glycémie).

Comme cela est le cas pour les suppléments en folates, nous espérons montrer que la prise de la molécule M peut être indiquée dans un contexte nutritionnel gestationnel non pathologique et/ou non nécessairement déséquilibré et que cela apporte un bénéfice réel pour la descendance.

Cette étude nécessite l'utilisation de modèles expérimentaux vivants. En effet, il n'existe pas actuellement de méthodes ou de modèles de substitution permettant d'étudier simultanément des paramètres de physiologie intégrée comme la prise alimentaire, la glycémie, le poids, l'adiposité, l'état hormonal etc. En effet, ces paramètres mettent en jeu des dialogues entre organes qui ne sont pas modélisables in vitro ou in silico. Ainsi le projet ELiSe II sera réalisé chez 152 souris, modèle de référence pour les études métaboliques précliniques, du fait de nombreuses similarités entre son métabolisme et celui de l'Homme.

Un suivi quotidien sera fait pour s'assurer du bien-être des animaux, tandis que les prises de mesures hebdomadaires (poids, prise alimentaire, consommation hydrique) seront effectuées. L'ensemble des procédures utilisées pour générer le modèle et pour les prises de mesure ont été optimisées et standardisées. Les mesures d'adiposité seront quant à elles effectuées sous anesthésie générale, évitant ainsi le stress de la contention lors du passage au scanner. De plus, les animaux sont élevés dans un environnement enrichi et contrôlé permettant l'expression de comportements innés et favorisant le soin maternel et la protection des animaux. Ce raffinement contribue au bien-être animal, ce qui réduit la variabilité interindividuelle engendrée par le stress, et par conséquent limite le nombre d'individus nécessaires pour les études statistiques.

12476 La filière porcine a connu ces dernières années plusieurs crises successives. En parallèle, les comportements des consommateurs évoluent, les protéines animales sont de moins en moins plébiscitées. Pour autant, le porc reste la première viande consommée en France et les attentes de goût et de qualité des consommateurs évoluent. Ces derniers sont à la recherche d'un porc bien élevé, bien nourri, et respectueux de l'environnement. C'est dans ce contexte que l'ensemble de la filière doit s'adapter pour répondre à l'évolution de ce marché. Ce projet s'intègre dans un projet plus large qui vise la production d'une viande de porc à qualité nutritionnelle et sensorielle améliorée pour développer une gamme de nouveaux produits innovants répondant à un moment de consommation cœur de repas et répondant aux enjeux de relocalisation de la production porcine avec l'utilisation de ressources alimentaires régionales.

Le protocole mis en place vise à mettre au point un programme alimentaire et de conduite d'élevage pour la production d'un porc charcutier répondant à ces nouvelles attentes. L'expérimentation sera conduite sur 60 porcs femelles issus de deux génotypes répartis en deux lots et nourris avec deux régimes alimentaires sur l'ensemble de la période de croissance (entre 30 et 115 kg). Le lot témoin de 30 porcs (15 de chaque génotype) sera alimenté avec un aliment « standard » et le second lot de 30 porcs (15 porcs par génotype) issus des mêmes parents sera alimenté avec un régime à base de ressources alimentaires régionales.

La règle des 3R a été prise en compte.

- Le remplacement n'est pas possible car les mesures sur animaux sont requises pour déterminer la qualité des viandes et des produits.

- Réduction. Le nombre d'animaux du protocole a été calibré afin de disposer du nombre minimum d'échantillons pour estimer de façon fiable la qualité des produits des 4 groupes d'animaux (15 porcs/groupe).

- Raffinement. Pour réduire leur inconfort en loges individuelles, les animaux seront placés dans la même salle et un contact visuel et olfactif permanent sera maintenu entre les animaux. Les deux régimes ont été formulés par des nutritionnistes pour satisfaire les besoins des porcs. Ils ne

présentent donc pas de carences susceptibles de nuire à leur croissance et à leur bien-être. Les animaux seront suivis quotidiennement par du personnel formé et expérimenté. En accord avec le cadre de conditions d'élevage normales, tout animal blessé ou malade sera sorti du lot et soigné en infirmerie selon les recommandations du vétérinaire en charge de l'élevage. Il pourra être sorti de l'expérimentation en cas de franchissement du point limite.

12477 L'ischémie-reperfusion est un phénomène inévitable en transplantation d'organe. L'ischémie correspond à la phase où l'organe du donneur est privé de la circulation sanguine et des apports en oxygène. La reperfusion de l'organe se traduit par la reprise de la circulation sanguine en lien avec le retour des apports en nutriments et en oxygène. Dans le cas de la transplantation hépatique, la séquence d'ischémie-reperfusion peut entraîner des lésions sévères du foie transplanté, à l'origine de dysfonctions du greffon à court et long terme et potentiellement du rejet de l'organe. Il est donc nécessaire de développer des stratégies afin de limiter ces lésions d'ischémie-reperfusion. L'objectif de cette étude est de tester une thérapie cellulaire en utilisant des progéniteurs endothéliaux issus de sang périphérique. Notre hypothèse est que ces cellules progénitrices ou leurs dérivés (microvésicules synthétisées par ces cellules) ont la capacité de participer à la régénération de l'endothélium vasculaire. L'origine isogénique de ces cellules issues de sang périphérique est un choix judicieux de par la non prise en compte des aspects immunologiques et du caractère peu invasif du prélèvement nécessaire pour l'obtention des cellules. Nous avons choisi le modèle murin d'ischémie-reperfusion hépatique car c'est un modèle animal établi. Les résultats attendus de cette thérapie cellulaire sont la diminution des lésions hépatiques, l'amélioration de la fonction hépatique et une meilleure régénération endothéliale. Cette thérapie pourrait être d'un intérêt majeur chez l'homme. La règle des 3 R a été prise en compte: 1) Ce processus expérimental ne peut être remplacé par un protocole in vitro. Seul un protocole in vivo peut reproduire la complexité des mécanismes physiologiques impliqués lors d'une séquence d'ischémie-reperfusion. 2) Le nombre d'animaux par groupe (12 animaux/groupe) est réduit au maximum, justifié et défini par un calcul de puissance, permettant de réaliser des tests statistiques pour identifier des différences biologiques et histologiques entre les groupes. Pour ce projet nous utiliserons 72 animaux divisés en 6 groupes (1 groupe contrôle et 5 groupes de séquence d'ischémie-reperfusion hépatique avec différentes modalités de thérapie cellulaire). 3) Le raffinement de cette étude a également été pris en compte, les animaux seront hébergés dans des locaux adaptés avec enrichissement du milieu et suivi quotidien de leur état de santé. De plus les traitements anesthésiques et analgésiques seront mis en place dans le but de minimiser la souffrance des animaux. Si les animaux atteignent un ou plusieurs points limites de souffrance, ils seront euthanasiés. Les tissus prélevés chez les animaux seront placés dans une banque d'organes/tissus murins afin de mutualiser les échantillons.

12478 Les troubles envahissants du développement, dont les troubles du spectre autistique (TSA) sont associés à des dysfonctionnements du comportement, de la cognition et de la perception. Un nombre croissant de preuves associe aussi depuis peu les TSA avec des troubles moteurs complexes, dont l'ataxie. Plusieurs cliniciens vont jusqu'à proposer que ces déficits moteurs peuvent être prédictifs des TSA surtout qu'ils semblent apparaître avant les troubles comportementaux et cognitifs. L'objectif du projet est de créer un modèle animal double transgénique : la souris « PV cre x CNTNAP2 KO » (fond génétique C57BL/6J). Cette souris aura les caractéristiques physiopathologiques de l'autisme (CNTNAP2 KO) avec la particularité de pouvoir cibler les interneurons Parvalbumines (PV) (PV Cre). Par la suite nous pourrions décomposer les réseaux neuronaux impliqués dans ce trouble au niveau anatomique, électrophysiologique et neurochimique.

Les modèles animaux de souris dans ces pathologies se sont révélés d'une grande utilité car ils permettent une étude horizontale allant de l'observation comportementale, à l'analyse des réseaux neuronaux et la détermination des messagers chimiques sous-jacents. La souris, et plus spécifiquement celle de race C57BL/6J est très utilisée comme modèle animal de troubles neurologiques et psychiatriques. De plus, l'utilisation de cette espèce et de cette race ouvre la porte

à l'utilisation de souris transgéniques portant des mutations spécifiques en phase avec notre projet de recherche sur les TSA. Les rongeurs sont à ce jour les espèces modèles de petite taille ayant un système nerveux moteur proche de l'Homme. Les souris (*Mus musculus*) ont l'avantage d'être un modèle de choix pour les études comportementales. Nous générerons 950 animaux aux phénotypes dommageables sur 5 ans.

Afin d'être en conformité aux règles 3R :

1) Remplacer : Le projet vise à créer une lignée de souris double transgénique qui permettra dans un second temps de caractériser les dysfonctionnements cognitifs et moteurs d'un modèle animal des TSA. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier.

2) Réduire : (i) Le nombre d'animaux choisis pour les accouplements permet la génération d'un nombre d'animaux suffisants en limitant la génération d'animaux surnuméraires. Les animaux seront gardés jusqu'à la baisse de leur fertilité naturelle ou dans le cas des animaux CNTNAP KO, jusqu'à l'apparition du phénotype dommageable (6mois).

3) Raffiner : Nous mettrons tout en œuvre pour soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des animaux. Des points limites sont définies et contrôlés pour éviter toutes souffrances potentielles.

12479 Il existe plus de 200 maladies neuromusculaires différentes tant par la gravité de l'atteinte musculaire que par ces conséquences sur l'organisme. Notre axe de recherche cible les maladies génétiques rares qui touchent les muscles dont les myopathies font partie. Ces maladies neuromusculaires entraînant une dégénérescence et une nécrose du tissu musculaire réduisant drastiquement l'espérance de vie. La myopathie de Duchenne, par exemple, touche environ 2 500 personnes en France et 18 600 en Europe.

Une étude antérieure en collaboration avec notre équipe a montré en 2018 une preuve de concept selon laquelle le tamoxifène, un médicament approuvé et validé pour traiter le cancer du sein, pourrait être réutilisé pour traiter une forme sévère de myopathie, la myopathie myotubulaire. Nous souhaitons valider son efficacité sur d'autres myopathies centronucléaires. Cette thérapie serait la plus rapide à appliquer aux patients, afin d'améliorer leur survie et leur autonomie.

Nous avons dans un premier temps étudié des modèles cellulaires puis des modèles animaux (souris). Désormais, nous souhaitons planifier un projet qui vise à mieux comprendre la maladie et à valider les propriétés d'une molécule à fort potentiel thérapeutique. Pour ces travaux il est nécessaire d'utiliser la souris, indispensable pour étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes. Nous souhaitons utiliser une molécule non toxique et qui est déjà utilisée chez l'homme et qui a déjà montré des améliorations spectaculaires dans une précédente étude. Par cette étude nous envisageons d'évaluer les conséquences fonctionnelles et thérapeutiques de l'administration chronique de tamoxifène sur la maladie, dans des nouveaux modèles de souris myopathes dont les mutations génétiques reproduisent fidèlement les symptômes musculaires de patients atteints de myopathies centronucléaires.

Des études cellulaires sont prévues afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. En revanche, seul le modèle animal permet d'étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes (REPLACEMENT).

Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire à l'étude, plusieurs procédures expérimentales seront réalisées avec un maximum d'un test par jour. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante pour déterminer si le traitement est efficace. Ainsi nous pouvons avancer que 10 souris au maximum par groupe seront nécessaires pour conclure sur le projet (REDUCTION).

Les myopathies sont des maladies qui affectent les muscles pouvant entraîner des difficultés pour se déplacer, de la nourriture sera placée dans la cage. Afin de s'assurer que les animaux ne souffrent pas, ils seront surveillés quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera

administré, soit les animaux seront euthanasiés prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT). Pour cette étude, 184 souris seront nécessaires.

12480 Les infections sexuellement transmissibles (IST) restent un problème de santé publique majeur chez l'homme, et peuvent amener à des stérilités, des maladies graves, comme les cancers ou les maladies infectieuses. De plus, la présence d'une IST chez un individu augmente le risque d'une nouvelle infection par une autre IST : ce sont les co-infections. Par exemple, une infection par la bactérie chlamydia ou par le virus herpes simplex 2 augmente le risque d'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1). Il est donc crucial de pouvoir réduire et prévenir ces IST.

La cavité vaginale contient de nombreux composants tels que du mucus, des protéines ou des bactéries qui constituent un microenvironnement dont la composition est modifiée par différents facteurs comme le cycle menstruel, la contraception ou les rapports sexuels. Il joue un rôle dans la susceptibilité aux IST. Certains composants sont décrits *in vitro* comme augmentant le risque d'infection alors que d'autres le diminuent. Un des moyens de lutte et de prévention contre les IST consisterait à moduler donc d'utiliser les composants du microenvironnement vaginal pour réduire le risque d'infection. Ces nouvelles stratégies nécessitent d'être évaluées dans une espèce proche de l'homme, le primate non humain (PNH). En effet, les résultats obtenus *in vitro* et dans d'autres espèces ne suffisent pas à prédire l'efficacité des traitements chez l'être humain. Le système immunitaire, la physiologie et l'anatomie des PNH, proches de celles de l'homme, permettent d'obtenir des données encore plus pertinentes sur l'efficacité de ces nouvelles stratégies. L'objectif du projet est de mettre en place ces stratégies de traitement chez le PNH et d'évaluer leur efficacité dans la prévention des IST. Seules les stratégies ayant montré leur efficacité *in vitro* et dans d'autres espèces seront évaluées chez le PNH.

La première partie du projet est une phase pilote pour évaluer plusieurs stratégies de modification du microenvironnement vaginal. Par exemple, des modifications des populations bactériennes présentes dans la cavité vaginale, du pH vaginal ou la présence de liquide séminal. Chaque stratégie sera évaluée sur un groupe de 4 animaux au maximum.

Dans une deuxième partie, l'efficacité des stratégies retenues sera évaluée dans un contexte d'IST virales ou bactériennes (comme par exemple l'infection par le virus de l'immunodéficience simienne SIV ou la bactérie Chlamydia). Les infections par voie vaginale par ces pathogènes sont capables d'induire les mêmes symptômes cliniques et biologiques chez le PNH que chez la femme. Ainsi la susceptibilité aux IST et aux co-infections (infection par plusieurs IST) sera évaluée chez des animaux dont le microenvironnement a été modifié et comparé à des animaux témoins. Chaque groupe expérimental (IST virales, bactériennes, coinfections et témoins) inclura un maximum de 10 animaux.

Sur 5 ans, Le projet prévoit au maximum 100 PNH nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'exploitation optimale des données. Les méthodes expérimentales sont raffinées et réfléchies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : traitements modifiant le microenvironnement vaginal, expositions aux pathogènes et prélèvements sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. Des échantillons biologiques produits dans ce projet seront conservés afin de limiter le recours au modèle PNH. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés en groupe dans des modules contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement de leur milieu de vie défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

12481 L'obésité et le diabète de type 2 connaissent une progression significative et synchrone depuis 30 ans de sorte que la pandémie de "diabesity" actuellement observée au niveau mondial constitue un réel enjeu de santé publique. Des études récentes ont révélé que des neuropeptides connus pour jouer un rôle crucial dans le contrôle hypothalamique du comportement alimentaire sont aussi

exprimés dans les îlots pancréatiques, suggérant que les neuropeptides hypothalamiques pourraient servir de lien entre l'homéostasie énergétique et glucidique, et constituer des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de l'obésité associée au diabète de type 2.

Le 26RFa est un neuropeptide hypothalamique découvert par notre équipe, et qui a été identifié comme le ligand endogène d'un récepteur humain orphelin, le GPR103. Le 26RFa stimule fortement la prise alimentaire chez les rongeurs, et cette activité orexigène du neuropeptide est renforcée chez les animaux soumis à un régime riche en graisse. L'expression du 26RFa est augmentée chez les souris et rats obèses. L'ensemble de ces observations suggère que le 26RFa pourrait jouer un rôle important dans le développement et le maintien de l'obésité.

Des travaux récents, menés par notre équipe, ont révélé que les taux plasmatiques de 26RFa étaient corrélés au statut énergétique et pathologique des individus (obésité, diabète) et que sa sécrétion est régulée par le glucose ingéré. Des résultats préliminaires montrent également que l'administration périphérique ou centrale de 26RFa à des souris atténue de façon importante l'hyperglycémie induite par une charge en glucose. L'ensemble de ces observations suggère que le 26RFa pourrait être un nouvel acteur important de la régulation périphérique et centrale de l'homéostasie glucidique et la compréhension de son rôle et de ses mécanismes d'action pourraient ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement du diabète de type 2.

Dans ce contexte, l'un de nos projets vise à déterminer si les mécanismes d'action mis en jeu par le 26RFa pour réguler l'homéostasie glucidique sont insulino-dépendants ou insulino-indépendants. Pour ce faire, nous étudierons la régulation et l'effet du 26RFa sur l'homéostasie glucidique, chez un modèle de souris déficient pour l'insuline et hyper-glycémique.

Seule l'utilisation d'un modèle mammifère intégré, donc *in vivo* chez l'animal entier, nous permettra de comprendre, de façon globale, le rôle de ce neuropeptide dans la régulation de la glycémie et d'établir des comparaisons pertinentes avec les données que nous avons obtenues chez l'homme. Pour cela, la souris présente de nombreux avantages pour l'élevage en animalerie : taille et coûts d'entretien réduits, fortes performances reproductives. De plus, la souris est un modèle animal largement utilisé pour les études de physiologie permettant une comparaison aisée de nos données avec celles d'autres équipes.

La réalisation de l'ensemble de ce projet nécessitera l'utilisation de 528 souris mâles C57Bl/6J. L'ensemble des effectifs seront détaillés par la suite, pour chaque procédure mise en œuvre et synthétisés sous forme de tableau en annexe 1.

Au cours de ce projet, nous appliquerons la règle des 3 R afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, les processus physiologiques étudiés seront analysés sur des lots de 12 souris par condition de traitement. Ces effectifs nous assureront d'obtenir des données statistiquement analysables. L'effectif des groupes d'animaux pourra être diminué à 10 lors des études concernant la régulation du 26RFa tout en conservant des données statistiquement fiables. De plus, les procédures, n'impliquant pas d'effet néfaste à long terme, pourront être menées successivement sur les mêmes animaux intercalés avec des périodes de repos au cours desquelles les paramètres physiologiques et le bien-être des souris seront régulièrement évalués.

En outre, les conditions d'élevage et de manipulation des animaux seront raffinées pour et minimiser au maximum leur souffrance éventuelle. Ainsi, des mesures permettant de palier le handicap généré seront mises en place. Notamment, les souris traitées à la streptozotocine conduisant à la déficience en insuline, recevront une injection quotidienne d'insuline pour compenser la déficience en insuline générée. De plus, l'ensemble des actes pouvant entraîner une douleur sera réalisé sous anesthésie (locale ou générale) et la douleur au réveil sera traitée par des analgésiques. C'est notamment le cas lors de l'implantation de canules en i.c.v. après laquelle les souris seront étroitement surveillées jusqu'à la disparition de tout signe de mal-être.

12482 Le but de mon projet est d'étudier le rôle des cellules endothéliales (CE), qui tapissent les vaisseaux sanguins, dans la progression du cancer afin d'identifier des composants moléculaires qui pourraient être cibler pour empêcher la dissémination métastatique. Le dysfonctionnement des CE rend les vaisseaux sanguins de la tumeur perméables. Cette caractéristique permet à certaines

cellules cancéreuses de passer dans la circulation sanguine (intravasation). Finalement, les cellules cancéreuses qui auront survécu dans la circulation et atteint un environnement tissulaire favorable à leur survie vont développer des métastases dans de nouveaux organes.

Au cours de ce projet, je vais: 1) caractériser le processus d'intravasation ; et 2) identifier les mécanismes qui peuvent être ciblés pour réduire la propagation des cellules cancéreuses et améliorer l'efficacité des traitements anti-cancéreux. Les résultats de ces expériences seront d'une grande valeur pour le développement de nouvelles stratégies anti-cancéreuses.

Le modèle murin est un des plus utilisé en recherche biomédicale du fait de sa proximité génétique avec l'homme, et de la possibilité d'effectuer des manipulations génétiques sur ces animaux. Pour la réalisation de ce projet sur 5 ans, jusqu'à 982 souris de la lignée C57BL6 seront utilisées. Pour les besoins spécifiques de cette étude, les CE des animaux sauvages (wild-type) et transgéniques expriment un marqueur fluorescent vert permettant leur identification. Des cellules tumorales murines seront injectées dans ces animaux afin de suivre le devenir des CE lors de la progression cancéreuse.

De plus, j'évaluerai sur des souris porteuses de tumeurs l'efficacité d'une nouvelle approche thérapeutique combinant de façon inédite des traitements de chimiothérapie, et des molécules ciblant le métabolisme cellulaire (glycolyse) que j'ai mises en évidence dans mes précédents travaux. Les effets de cette thérapie combinée seront mesurés sur l'intravasation et dissémination métastatique. Je fais l'hypothèse que la protéine Snail est directement impliquée dans le dysfonctionnement des CE, et par conséquent dans la perméabilité des vaisseaux sanguins. La contribution de Snail aux mécanismes moléculaires menant à l'intravasation sera étudiée dans un modèle murin génétiquement modifié afin d'être dépourvu de cette protéine. La progression tumorale sera plus précisément suivie dans des souris où l'expression de Snail est réprimée spécifiquement dans les CE.

Les expérimentations sur les animaux seront remplacées autant que possible par des expériences sur des modèles *in vitro*. Cependant, la complexité des interactions cellulaires dans le microenvironnement de la tumeur ne peut être étudiée que dans le contexte tissulaire *in vivo*. Les études précliniques chez la souris sont donc fondamentales pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la progression tumorale. Ces expériences seront utilisées pour confirmer, à l'échelle de la tumeur, les résultats obtenus *in vitro*, et supporteront ainsi l'aspect translationnel des recherches. Dans le but de réduire le nombre d'animaux euthanasiés, j'ai effectué une recherche préalable de la littérature concernant des études précliniques similaires. De plus, j'ai conduit une étude statistique pour définir le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Tous les modèles expérimentaux animaux présentés sont déjà disponibles dans le laboratoire. Toutes les expérimentations animales seront conduites de façon à supprimer ou minimiser la douleur dès que possible grâce à l'analgésie, qui sera utilisée selon les critères légaux et éthiques prévus par la loi. Un enrichissement sera mis en place dans les cages, tels que des tunnels, ce qui permettra de diminuer le stress chez l'animal et d'augmenter sa capacité à s'adapter à l'environnement. L'état de bien être des souris sera évalué quotidiennement par l'observation des signes physiologiques (perte de poids, aspects du pelage, morsures, etc). Les souris seront euthanasiées à la fin de l'expérience. Les expériences seront interrompues si les animaux cessent de se déplacer facilement et spontanément, s'ils perdent 10% de leur poids lors de la progression tumorale (max 2000 mm³ en cas de tumeurs sous-cutanée), ou s'ils présentent un inconfort évident, même après l'application un traitement analgésique.

12483 De nos jours il est observé une recrudescence du nombre d'infections dues à des bactéries multi-résistantes. Faute d'antibiotiques efficaces face aux plus résistantes de ces bactéries, les médecins se retrouvent obligés de se tourner vers de vieilles molécules tombées en désuétude, et lorsque ces vieilles molécules ne suffisent pas à traiter l'infection, les médecins n'ont d'autre choix que d'associer de façon empirique plusieurs antibiotiques. Cette situation est très préoccupante dans la mesure où les laboratoires pharmaceutiques se sont largement désengagés de ce domaine de recherche, peu rentable, et que très peu de nouvelles molécules antibactériennes sont en cours de

développement. Ainsi le contrôle de la résistance bactérienne aux antibiotiques est devenu un enjeu de Santé Publique majeur, les antibiotiques étant des molécules extrêmement précieuses.

Dans notre projet, nous avons dans un premier temps testé in vitro l'efficacité de nombreux antibiotiques soit administrés seuls, soit en combinaison sur différentes souches d'*Acinetobacter baumannii* (bactéries Gram-négatif) ayant différents spectres de résistance aux antibiotiques. Trois médicaments ayant une efficacité prononcée sur la bactérie, notamment en combinaison ont été identifiés : La polymyxine B, la minocycline et la rifampicine.

La polymyxine B est un antibiotique mis sur le marché à la fin des années 1950. Cette molécule a été abandonnée à la fin des années 60 en raison de la commercialisation d'antibiotiques plus facilement maniables et moins toxiques. Toutefois, depuis le milieu des années 2000 et la recrudescence des résistances vis-à-vis des antibiotiques existants, la polymyxine B est revenue sur le devant de la scène comme étant la dernière ligne de défense dans le traitement des infections pulmonaires à bactéries Gram-négatif multi-résistantes.

La minocycline est un antibiotique de la famille des tétracyclines commercialisé dans les années 1960 sous forme orale et intraveineuse approuvé par la Food and Drug Administration dans le traitement des infections à *Acinetobacter baumannii*.

La rifampicine est un antibiotique de la famille des rifamycines commercialisé à la fin des années 1960 qui a d'abord montré son efficacité dans le traitement d'infections dues à des mycobactéries telles que la tuberculose et la lèpre. Des travaux récents ont montré l'utilité d'associer la rifampicine à d'autres antibiotiques tels que la polymyxine B dans le traitement d'infections dans des modèles in vivo.

Après des études in vitro et une étude réalisée sur un modèle d'infection du muscle de la souris, il nous faut maintenant évaluer l'efficacité sur un organe encore plus difficile à traiter, le poumon. L'objectif de ce projet est donc de réaliser une étude d'efficacité in vivo de ces antibiotiques administrés seuls et en combinaison chez la souris présentant une infection du poumon, ceci afin d'identifier les meilleures combinaisons et schémas posologiques à tester ultérieurement chez l'homme. Le modèle d'infection utilisé dans ce projet est donc un modèle d'infection pulmonaire à *Acinetobacter baumannii* chez la souris neutropénique. 548 souris vont être utilisées pour ce projet. Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

- « Remplacer » les modèles animaux : Le remplacement des animaux est impossible car les tests d'efficacité in vitro ont été réalisés et l'étape suivante dans l'optimisation de l'utilisation des antibiotiques en combinaison est une étude in vivo chez l'animal car aucun modèle in-vitro ne permet de prendre en compte l'ensemble des paramètres déterminant l'efficacité clinique et la tolérance d'un antibiotique seul et ou en association

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum dans les groupes afin de détecter des différences significatives entre les différents traitements testés. Notamment, le nombre de souches utilisées lors des différentes étapes de ce projet varie. L'étude de pharmacocinétique nécessaire à l'interprétation des résultats n'a pas été refaite dans ce projet sachant que nous possédons des données de pharmacocinétique de ces antibiotiques chez la souris présentant une infection musculaire et que nous avons fait l'hypothèse que la pharmacocinétique ne serait pas modifiée avec le type d'infection. Tous ces aménagements contribuent à limiter le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption): Nous allons porter une attention particulière au bien-être des animaux. Le suivi régulier (2 fois par jour) des animaux permet d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité/apathie), cris, mobilité, alimentation... Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié. Ce suivi sera matérialisé par des grilles d'observations dont l'évaluation sera faite à la fin de chaque étape de l'expérimentation. Aussi, les animaux vigiles sont placés dans un environnement thermostaté, avec libre accès à la nourriture et à l'eau et luminosité contrôlée et alternance

veille/sommeil. Les conditions d'asepsie lors de l'administration de l'inoculum et des traitements seront préservées.

Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi (rouleaux de papier, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

12484 Le microbiote intestinal est composé de bactéries en grande quantité et en grande diversité (les Bacteroidetes et Firmicutes sont les phyla prédominant). Les interactions entre le microbiote intestinal et les cellules de l'hôte jouent un rôle bénéfique dans la défense de l'hôte contre certaines bactéries intestinales pathogènes, comme *Citrobacter rodentium*. Le modèle de colite induit par *Citrobacter rodentium* est d'un grand intérêt car la réponse appropriée à ce pathogène bactérien entérique nécessite de nombreux processus biologiques impliqués dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Des données récentes suggèrent que la co-infection avec le Norovirus pourrait également jouer ce rôle bénéfique contre *Citrobacter rodentium* par les mécanismes dépendant ou non de la flore intestinal qui restent à être identifiés. Alors que la majorité des études se focalisent sur le rôle du microbiote intestinal ou de la réponse de l'hôte au cours de l'infection entérique bactérienne, notre protocole repose sur l'analyse simultanée du Norovirus, de l'hôte et de *Citrobacter rodentium*. L'objectif principal de notre projet est donc de déchiffrer les mécanismes dépendants et indépendants de la flore intestinale par lesquels le Norovirus régule la virulence de *Citrobacter rodentium*, la fonction de barrière intestinale et l'immunité humorale contre ce pathogène. Pour atteindre notre objectif, nous avons élaboré une approche intégrée "microbiote/immunologie" en deux volets: i) identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires par lequel le Norovirus facilite l'éradication de *Citrobacter rodentium* comme modèle expérimental de pathogène bactérien entérique. ii) évaluer les mécanismes spécifiques par lesquels le Norovirus contrôle la virulence de *Citrobacter rodentium* indépendamment de la flore bactérienne. Les expériences de ce projet impliqueront un maximum de 6120 souris sur 5 ans, et seront effectuées dans la zone d'isotechnie et NSB2. Un suivi des souris sera effectué par du personnel formé et habilité. Nous utiliserons notamment des modèles transgéniques axéniques, traités avec des antibiotiques ou avec des compositions de microbiotes variées. Il est à noter aussi que préalablement aux expériences sur animaux, des études in vitro et in vivo ont permis de définir les méthodes de raffinement (avec un modèle d'infection par le Norovirus et/ou *Citrobacter rodentium* sur des cultures de macrophages et de cellules épithéliales) et de réduction (par une analyse multiparamétrique des animaux). Dans son ensemble, notre protocole permet d'explorer le dialogue hôte-microbiote en intégrant la réponse de l'hôte à la co-infection Norovirus-*Citrobacter rodentium* en ayant recours à des souris génétiquement modifiées et gnotoxéniques, la transcriptomique, le séquençage à haut débit et la biologie des systèmes. Déchiffrer les interactions complexes entre le microbiote intestinal et son hôte améliorera notre compréhension de la pathogenèse des nombreuses maladies humaines pour lesquelles le microbiote a été identifié comme un acteur principal (incluant les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaque, le diabète de type 1, l'obésité et la stéato-hépatite non-alcoolique) et fera découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques.

12485 Notre système immunitaire est constitué de multiples types cellulaires différents, œuvrant de façon coordonnée dans le temps et dans l'espace. Au sein de ce système complexe, les cellules dendritiques jouent un rôle de premier ordre : ces cellules, notamment présentes dans les tissus en contact avec l'extérieur, forment un réseau de cellules « sentinelles » capables de détecter des menaces pour l'organisme, qu'il s'agisse de pathogènes ou de cellules tumorales. Après reconnaissance de ces menaces, ces cellules peuvent capturer des antigènes, c'est à dire des molécules dérivées de pathogènes ou de cellules tumorales ; elles migrent ensuite dans les organes lymphoïdes secondaires où elles initient la réponse immunitaire en présentant ces antigènes aux lymphocytes T, un autre type de cellules immunitaires.

Dans le cadre des réponses anti-tumorales, certains lymphocytes T, dits cytotoxiques, constituent les effecteurs capables de détruire les cellules cancéreuses. La présentation d'antigènes à ces

lymphocytes est réalisée grâce à un processus essentiel appelé présentation croisée. Ce mécanisme comporte plusieurs étapes intracellulaires, dont une étape absolument cruciale et pourtant mal caractérisée : l'export cytosolique des antigènes. Notre objectif consiste à comprendre, au niveau moléculaire, comment se déroule cette étape clé et limitante de la présentation croisée. L'utilisation de lignées de cellules dendritiques immortelles nous a permis de caractériser l'implication de certaines protéines dans ce mécanisme, in vitro, grâce à un système de co-culture cellules dendritiques/lymphocytes T.

Nous cherchons désormais à valider leurs contributions aux réponses immunitaires in vivo, à l'échelle d'un organisme, au sein d'un micro-environnement physiologique, ce que le modèle in vitro ne permet de rendre compte que de façon très partielle. En l'absence d'un modèle murin viable (nos protéines d'intérêt sont en effet indispensables au fonctionnement cellulaire), nous injecterons des cellules dendritiques (déficientes pour notre protéine d'intérêt), au préalable incubées en présence d'antigène, dans des souris afin d'étudier leur capacité d'induction des réponses immunitaires cytotoxiques in vivo.

Notre projet nécessitera un total de 108 souris. Il s'agit du nombre de souris nécessaires à l'obtention d'une significativité statistique.

Les procédures seront réalisées sous anesthésie, afin de minimiser le stress causé à l'animal. Par ailleurs, les injections seront réalisées dans un volume minimal, afin de réduire au maximum l'inconfort causé à l'animal.

Grâce à cette meilleure compréhension du déroulement de la présentation croisée, nous espérons augmenter l'efficacité de ce mécanisme et donc favoriser la protection tumorale.

12486 La fibrose hépatique est la conséquence de toutes les maladies chroniques du foie et ce, quelle qu'en soit la cause (virus, médicaments, alcool, obésité). La cirrhose représente un stade évolué de la fibrose et s'accompagne d'une perte progressive des fonctions hépatiques et peut évoluer dans un certain nombre de cas vers le cancer hépatique. Plusieurs études démontrent que la morphologie des mitochondries (morphologie mitochondriale ou dynamique mitochondriale) joue un rôle majeur dans les différentes fonctions mitochondriales et le métabolisme hépatique. Actuellement, il n'existe aucun modèle spécifique permettant l'étude de la morphologie mitochondriale in vivo dans le développement des pathologies hépatiques. Nous avons créé des modèles murins qui nous permettent de manipuler la morphologie mitochondriale avec des outils génétiques ciblant le gène MTP18. MTP18 a déjà été décrit comme médiateur essentiel de la morphologie mitochondriale in vitro. Pour respecter la règle des 3R, la caractérisation de MTP18 comme manipulateur de morphologie mitochondriale a d'abord été réalisée in vitro dans des lignées cellulaires hépatiques. Ces modèles ont permis une première caractérisation de l'activité de division mitochondriale de ce facteur MTP18 et identification du mécanisme par lequel ce facteur de division contrôle la morphologie mitochondriale ainsi que les conséquences métaboliques à l'intérieur des mitochondries lors d'un changement morphologique. In vitro, ceci représente l'outil le plus spécifique pour étudier la morphologie mitochondriale. Par contre, les cellules en culture ne développent aucune pathologie retrouvée chez les patients avec des maladies hépatiques. Au vu des premiers résultats encourageants, nous proposons de mettre en place in vivo des nouveaux modèles de maladies mitochondriales ciblant le foie chez la souris en les croisant ensemble, afin de mieux comprendre les rôles des mitochondries dans le développement des pathologies. Nous étudions des modèles de souris mimant soit l'invalidation (knockout) soit la surexpression (transgénique) de ce gène. L'étude de ces modèles au cours du temps (état clinique) et sous stress hépatique comme le régime diabétogène (120 souris), le régime déficient en méthionine et choline (60 souris), ou l'induction de stéatose (60 souris) par le tétrachlorure de carbone (CCl4) nous permettent de mieux comprendre les processus mis en cause afin d'envisager des voies d'intérêt thérapeutiques dans l'avenir. De plus, ces modèles souris représentent des outils de choix pour tester des molécules pharmacologiques afin de ralentir ou inverser les processus pathologiques. Trois procédures expérimentales de sévérité modérée seront mises en œuvre. Nous nous efforçons de raffiner nos expérimentations et de réduire toutes les souffrances inutiles à l'animal. Nous utiliserons une grille de score pour identifier les points limites et veillerons à ce que les souris

n'atteignent pas un score supérieur à 2 (perte de poids >15% relatif à la moyenne d'une souris témoin du même âge, ou présence de poils très ébouriffés, posture anormale ou comportement très agité ou immobile, auto mutilation). Nous effectuerons un suivi régulier de nos animaux et utiliserons des analgésiques quand cela sera nécessaire. De manière à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés, nous avons travaillé avec des statisticiens pour déterminer le nombre d'animaux strictement nécessaires pour obtenir des résultats exploitables (des analyses de puissance ont été réalisées). Le respect de la règle des 3R est aussi assuré par analyse de paramètres multiples chez chaque animal, l'obtention d'animaux contrôles et mutants dans les mêmes croisements, l'utilisation de tests statistiques adaptés (Student's t-test, ANOVA) ainsi que le suivi quotidien et le respect des points limites. Cette étude est prévue sur 5 ans et nécessitera au total 240 souris mâles adultes entre 1 et 12 mois d'âges.

12487 En 2018, l'hémorragie intracérébrale (HIC) reste l'accident vasculaire cérébral le plus dévastateur. En effet, en 2018 une proportion de 50% de patients en sont morts et environ 30% deviennent dépendants 4 ans plus tard. De plus, en dépit de nombreuses études, aucun traitement efficace n'a été trouvé à ce jour.

Grâce aux modèles animaux d'HIC, il a été prouvé que la survenue d'une hémorragie intracérébrale s'accompagne d'un œdème autour de l'hématome (dit « péri-hématome »), aggravé par l'expansion de processus neuro-inflammatoires, et considéré comme un marqueur de mauvais pronostic. Cependant, l'évolution temporelle comme la signification biologique et clinique de ce processus œdémateux demeurent inconnus.

Le but de ce projet est de décrire l'évolution temporelle de l'œdème péri-hématome, et d'en identifier les marqueurs prédictifs dans un contexte d'HIC induite chez le rongeur. Par la suite, de potentiels agents neuroprotecteurs seront évalués afin d'essayer de trouver des thérapeutiques efficaces pour limiter la progression de cette pathologie.

Ces évaluations précliniques n'interviennent qu'après avoir spécifiquement évalué et sélectionné in vitro de nouveaux « médicaments candidats », basés sur leurs propriétés anti-inflammatoires, et ce afin de limiter au mieux le nombre d'animaux (Réduire). De même, il n'est pas possible de reproduire in vitro la physiopathologie complexe de l'HIC, ce qui nécessite le recours à des modèles in vivo (Remplacer). Les procédures sont définies au mieux pour offrir le maximum de confiance dans les résultats générés dans le respect du bien-être des animaux en limitant la souffrance animale (points limites) (Raffiner).

Le nombre total d'animaux envisagé sur les 5 ans à venir est estimé au maximum 924 animaux, répartis en 4 procédures et sur les 2 sexes (mâles et femelles).

12488 De nombreux protocoles de recherche actuels ont pour but d'arrêter ou de ralentir les processus dégénératifs touchant les photorécepteurs tels que ceux retrouvés dans les rétinopathies pigmentaires et les dégénérescences maculaires, la DMLA en chef de file. Cependant, une fois ces maladies arrivées à un stade avancé de leur processus évolutif, la cécité et le handicap visuel ne peuvent plus être évités et seules des prothèses rétiniennes pourraient restaurer l'information sensorielle sans avoir recours à la thérapie génique. La stratégie consiste à stimuler électriquement la rétine avec ces implants pour restaurer une vision partielle. Bien que des patients soient déjà implantés à l'heure actuelle, cette stratégie ne permet pas la restauration d'un niveau de vision suffisamment précis pour rendre ces patients autonomes. Ces dernières années notre connaissance des mécanismes neurophysiologiques à l'origine de la faible résolution des implants a progressé ainsi que la technologie dédiée à ce type d'application. Le premier défi à l'heure actuelle consiste à stimuler électriquement et très localement certaines cellules de la rétine en évitant la diffusion passive des courants et l'activation des axones ou fibres nerveuses des neurones de la rétine. Le second consiste à déchiffrer le mode de communication des neurones de la rétine et des aires visuelles du cerveau pour injecter la bonne information via les implants rétiniens.

Pour ce faire, nous proposons de commencer nos travaux sur un modèle rongeur sain et pathologique (Brown Norway : max 50 rats sains et 50 rats porteurs d'une dégénérescence rétinienne progressive d'origine génétique) pour graduellement passer à un modèle primate non-

humain (PNH : 3 macaques rhésus) pour se rapprocher du système visuel de l'Homme, soit 103 animaux au total pour 5 ans. Le passage au macaque permettra de travailler en fin d'étude sur un système visuel plus proche de l'Homme où la transversalité prend alors tout son sens. Ces travaux suivront une approche aigue, donc réalisés uniquement sous anesthésie générale et analgésie appropriée, à l'issue desquelles les animaux seront euthanasiés. Ils consistent à implanter une rétine artificielle et à enregistrer l'activité de la rétine et des aires corticales visuelles suite à une stimulation visuelle naturelle comparée à une stimulation électrique de la rétine via les implants. Chez les mêmes animaux il nous sera possible de comparer l'activation naturelle et prothétique du cerveau et de modifier les paramètres de stimulation électrique pour se rapprocher d'un fonctionnement naturel. Dans une optique de « raffinement », nous débuterons sur un modèle rongeur sain permettant de mettre au point une nouvelle technique de stimulation électrique visant à activer uniquement les structures rétinienne désirées. Le modèle rongeur pathologique nous permettra d'adapter ces paramètres aux caractéristiques modifiées d'une rétine pathologique. Ce n'est qu'ensuite que s'effectuera le passage au modèle PNH dont le système visuel est très proche de l'homme avec un hébergement en groupe en milieu enrichi. Un effort particulier sera apporté au contrôle de l'anesthésie (monitoring de la profondeur à l'EEG), de la paralysie (électro-stimulation musculaire et ventilation contrôlée) et à la gestion de la douleur (analgésie morphinique). Le volet « remplacement » est impossible dans ce projet car trop invasif pour l'Homme et des études in silico sont inenvisageables. Enfin pour se conformer à l'aspect « réduction » de la règle des 3R, nous avons introduit un «go/no go» pour deux techniques novatrices de stimulation. Si des résultats non probants sont observés chez les rongeurs, ces protocoles ne seront pas utilisés chez les PNH. De plus, nous apporterons un soin particulier à inclure uniquement des PNH provenant d'autres projets, ceci pour éviter l'utilisation d'animaux naïfs.

12489 Les maladies regroupant ce qu'on appelle les troubles du spectre autistique (TSA) se caractérisent par un déficit des interactions sociales et de la communication ainsi que par des comportements restreints et répétitifs. Elles affectent 1 enfant sur 68 aux USA et constituent un problème majeur en termes de santé publique. De nombreuses études effectuées chez l'homme font état, dans le cerveau des individus autistes, d'un changement des réseaux neuronaux. Au cours du développement embryonnaire, les neurones ne sont pas tous générés au même moment, mais par vagues successives. Ils naissent dans une région particulière du système nerveux central avant de migrer à leur destination finale selon un programme prédéfini qui permet la construction et la maturation progressive du cerveau. Notre hypothèse est, qu'en cas d'autisme, ce programme est perturbé. Notre projet a pour but de suivre le développement de neurones générés à différents stades embryonnaires chez la souris saine versus autiste. Pour cela nous allons travailler sur un modèle de souris génétiquement modifiée dans lequel certains neurones exprimeront, sous condition, une molécule fluorescente. Nous observerons les modifications inhérentes au développement de ces neurones à différents âges grâce à des expériences effectuées post-mortem chez la souris saine versus autiste et déterminerons si ces changements ont un lien avec les perturbations rapportées chez les souris autistes adultes. Déterminer si et comment chaque génération de neurones est affectée en cas d'autisme permettrait d'établir une stratégie thérapeutique spécifique.

Le projet se divise en 3 phases impliquant 784 souris sur une durée de 3 ans et demi.

Phase 1 : validation du modèle de souris autiste grâce à des tests de comportement.

Phase 2 : exploration globale des effets de la maladie sur le cerveau et à différents stades de développement, par visualisation des neurones fluorescents.

Phase 3 : collecte des paramètres morpho-fonctionnels des neurones fluorescents dans plusieurs régions d'intérêt déterminées en Phase 2 à différents stades de développement.

Sur les animaux, nous effectuerons les manipulations suivantes :

1. Administration d'une substance qui induira l'expression de la fluorescence dans les neurones. Le produit sera dissout dans de l'huile et introduit dans l'estomac des femelles gestantes via une canule

à bout rond (afin d'éviter toute blessure). L'utilisation de l'huile permettra l'introduction aisée de la canule. Le volume introduit sera calculé pour ne pas causer de douleur par distension de l'estomac.

2. Traitement au VPA, une substance connue pour induire l'autisme chez les petits. Le produit sera dissout dans une solution saline et injecté dans la cavité péritonéale des femelles gestantes. Le volume injecté sera calculé pour ne pas causer de douleur par distension de la paroi abdominale.

Après ces manipulations, les souris seront surveillées pour détecter le moindre signe de détresse et placées en cages individuelles équipées, en plus de l'enrichissement de base (maisons en carton spécial rongeurs qui permet aux animaux de s'abriter pour dormir, mais aussi de pratiquer certains exercices physiques comme grimper et explorer) de matériaux spécifiques pour la nidification afin de préparer la mise-bas.

3. Les tests de comportement. Effectués chez le jeune adulte, ces tests ont pour but de valider l'induction de syndromes autistiques sur notre modèle de souris. Il s'agira de placer les souris dans certaines situations et d'observer leur comportement. Ce type de procédure n'engendrera ni douleur, ni contrainte chez les animaux qui seront hébergés en groupes sociaux dans des cages équipées de matériaux d'enrichissement.

Cette étude se focalise sur l'organisation des réseaux neuronaux autour de la naissance, et ne peut donc être effectuée sur des modèles de cultures cellulaires in vitro. Cependant, pour limiter le nombre d'animaux, le projet a été planifié afin d'appliquer au mieux les principes de réduction et de raffinement dans le respect de la règle des 3R. En effet, nous avons déterminé de manière statistique le nombre d'animaux que nous allons utiliser par objectifs et par tâches. Dans cette même optique, quand cela sera possible, chaque souris servira à plusieurs mesures, réduisant encore le nombre d'animaux. Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement via la mesure de leurs poids et l'observation de leur aspect et comportement (points limites).

12490 Des études cliniques menées dans les années 50, complétées par des travaux expérimentaux sur des modèles animaux, ont montré que l'hippocampe est une structure cérébrale qui joue un rôle central dans certaines formes de mémoire, en particulier la mémoire épisodique et la mémoire spatiale. La mémorisation de nouvelles informations pendant l'éveil aboutit à la formation de souvenirs labiles, qui doivent ensuite être renforcés pour pouvoir être maintenus à long terme. Ce renforcement est appelé « consolidation », et se produit tout particulièrement pendant le sommeil. Ces deux étapes mettent en jeu des échanges d'information entre l'hippocampe et le cortex, mais font intervenir tout un ensemble de rythmes cérébraux différents : par exemple, pendant l'exploration, l'hippocampe génère un rythme puissant et régulier appelé « thêta » (8 Hz) ; en revanche, pendant le sommeil à ondes lentes, il génère des oscillations beaucoup plus rapides appelées « ondulations » (200 Hz), tandis que le cortex est le théâtre d'oscillations lentes (0,5-4 Hz) mais également de « fuseaux thalamo-corticaux » (15-20 Hz). Ces nombreux rythmes agissent comme des horloges internes qui influencent l'activité des structures cérébrales et leurs échanges, et jouent donc un rôle fondamental, mais ce rôle est encore mal compris. Les divers dysfonctionnements qui peuvent affecter ce système complexe se traduisent par différentes conditions ou pathologies, souvent liées à la mémoire, comme la maladie d'Alzheimer, mais pouvant également avoir des effets plus généraux, comme l'épilepsie. Il est donc fondamental de mieux comprendre la physiologie de l'hippocampe et de ses échanges avec le cortex.

Des travaux récents ont confirmé que les ondulations hippocampiques jouent un rôle primordial dans la consolidation mnésique, une hypothèse fondatrice proposée il y a vingt ans, qui avait inspiré de très nombreux travaux mais n'avait jamais été confirmée. Depuis, le rôle complémentaire du cortex a également été confirmé.

Pour mieux comprendre les mécanismes de la formation et de la consolidation de la mémoire, nous étudierons les activités des réseaux neuronaux impliqués et leurs interactions pendant le comportement et le sommeil. Pour ces expériences, nous utiliserons des souris et des rats (au maximum 460 par espèce, soit 92 par an ; âge : 2-6 mois), qui constituent les modèles animaux de référence pour l'étude de la mémoire spatiale (les souris permettant l'utilisation de techniques

génétiques et moléculaires plus avancées, tandis que les rats permettent l'enregistrement de plus grands nombres de neurones et l'apprentissage de comportements plus élaborés). L'essentiel de ces animaux servira au marquage fluorescent des structures cérébrales à étudier (hippocampe, cortex) pour permettre d'enregistrer l'activité de très grands nombres de neurones grâce à des technologies de pointe (imagerie calcique ou dépendant du voltage). Nous interrompons les tests dès que des paramètres optimaux auront été déterminés, et nous attendons donc à utiliser un nombre nettement moins important d'animaux. De plus, ce nombre maximal est conforme avec la littérature scientifique, et a été ramené à une fourchette basse grâce à l'utilisation de microscopes sur mesure développés par des collègues physiciens ayant des caractéristiques supérieures aux produits commerciaux, mais aussi en tirant parti de l'expertise de nos partenaires commerciaux pour l'amélioration du marquage fluorescent, et de tests statistiques avancés pour augmenter la fiabilité et la puissance de nos analyses.

Nous évaluerons les performances des animaux pendant des tâches de mémoire spatiale, et nous étudierons les modifications induites au niveau d'ensembles de neurones enregistrés simultanément dans une ou plusieurs structures cérébrales. Cette double approche comportementale et neurophysiologique nous permettra de mieux comprendre les mécanismes de la consolidation mnésique.

L'étude du comportement et l'enregistrement dans plusieurs aires cérébrales simultanément ne peut s'effectuer *ex vivo*. Pour limiter autant que possible le nombre d'animaux requis pour ce travail, nous utiliserons des technologies d'enregistrements de pointe permettant d'échantillonner les réponses de dizaines de neurones à différents niveaux (hippocampique, cortical, sous-cortical), dans le but de maximiser l'information obtenue pour chaque animal. Les chirurgies se feront en conformité avec la réglementation (anesthésie et antalgie appropriées), et les légères restrictions alimentaires nécessaires à la motivation des animaux et pour éviter le surpoids feront l'objet d'un suivi méticuleux (surveillance quotidienne, alimentation à volonté dès que la diminution du poids dépasse 15%). Une attention particulière sera portée à la qualité de l'hébergement et des tests comportementaux des animaux (fond sonore musical, cages transparentes et proches des congénères, suivi individuel tout au long des expériences, familiarisation avec les expérimentateurs avant les tests comportementaux, utilisation de récompenses alimentaires, absence de stimuli aversifs, etc.) de manière à respecter au mieux leur bien-être.

12491 Le système endocannabinoïde (SEC) est un système biologique complexe mettant en jeu des molécules analogues à celles trouvées dans le cannabis. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques. Ce système est essentiellement composé de 2 récepteurs (CB1R et CB2R) et de molécules produites par l'organisme appelées endocannabinoïdes. En plus d'augmenter la sensation de faim de manière comparable au Cannabis, l'activation du SEC et plus particulièrement des récepteurs CB1R par les endocannabinoïdes favorise le stockage des graisses et ralentit le métabolisme énergétique chez l'Homme et le rongeur. C'est pourquoi un médicament anti-obésité (le rimonabant) visant à réduire l'activité du SEC a été mis sur le marché en 2006. Malgré une efficacité avérée dans la réduction de la masse corporelle et de l'amélioration des paramètres métaboliques chez les patients obèses et/ou diabétiques, ce dernier a été retiré du marché en 2008 à cause de ses effets psychotropes secondaires parfois sévères dus au blocage de l'activité du SEC dans le cerveau. Cependant, plusieurs éléments ont indiqué que les effets bénéfiques observés avec le rimonabant étaient essentiellement dus au blocage des CB1R exprimés par les tissus périphériques (autres que le cerveau). Ainsi le développement de nouvelles molécules bloquant CB1R (antagonistes) présentant une action limitée en périphérie c'est-à-dire ne pouvant pas atteindre le cerveau représente une nouvelle stratégie thérapeutique pour lutter contre les pathologies associées à l'obésité. D'ailleurs, plusieurs bloqueurs des récepteurs CB1R n'agissant pas sur le cerveau ont été développés. Parmi eux, le JD-5037 vient d'obtenir l'autorisation d'entrer en étude clinique de phase 1 dans le cadre de la prise en charge des maladies hépatiques associées à l'obésité. A travers une collaboration avec des chimistes, nous souhaitons poursuivre ces efforts en participant au développement de nouvelles molécules candidates et à but thérapeutique.

Avant de tester les effets métaboliques potentiels de nos molécules sur des souris obèses (c'est l'objet d'un autre projet expérimental), il convient de déterminer si l'action de nos composés est effectivement limitée à la périphérie. Pour cela, nous allons vérifier que l'administration de ces composés ne conduit à aucun effet central néfaste comme un développement d'anxiété, de dépression ou autre. Ainsi, l'utilisation du modèle animal (souris) s'impose dans ce projet. Il existe des modèles in vitro permettant de valider le passage de molécules dans le cerveau mais cette approche ne renseigne en rien sur les effets psychotropes et comportementaux éventuels de ces molécules. Nous soumettrons donc les souris à une série de tests comportementaux bien décrits dans la littérature (procédures 1 à 3). De plus, un test complémentaire caractérisant un blocage des CB1R périphériques sera réalisé (mesure du transit gastro-intestinal ; procédure 4).

Ainsi, nous utiliserons un total de 320 souris C57BL6J mâles adultes qui recevront des activateurs de CB1R ainsi que des bloqueurs soit déjà caractérisés et servant de contrôle, soit des molécules créées au laboratoire avec nos collaborateurs Nantais.

Certaines approches comportementales nécessitant l'utilisation d'animaux naïfs, c'est-à-dire n'ayant jamais été mis en situation de test (procédure 1), nous devons prévoir un nombre de souris important (240). Cependant, ces 240 souris seront ensuite intégrées dans 2 procédures différentes permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux final.

Pour tous les animaux, nous opérerons un suivi quotidien afin de détecter tout dommage imprévu et ainsi intervenir pour soulager/abrèger toute souffrance. Toutefois, aucune procédure incluse dans ce projet ne doit induire de douleur ou de souffrance chez l'animal. Ainsi, aucune anesthésie ou traitement avec un agent antidouleur n'est nécessaire. Cependant, l'activation des récepteurs CB1R dans le cerveau pouvant induire une hypothermie légère, les souris seront placées sur un tapis chauffant en cas de diminution non contrôlée de la température corporelle. Si malgré toute notre attention, des signes de souffrances sont observés, les animaux auront accès à un traitement antalgique afin de les soulager.

Afin d'enrichir le milieu, tous les animaux auront à leur disposition des carrés de cellulose, une maisonnette et des bâtons à ronger. Enfin, le nombre d'animaux utilisé a été réduit au minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet.

Nous espérons que ces travaux nous permettront d'identifier et de caractériser de nouvelles molécules permettant de moduler l'activité du SEC et ainsi proposer de nouvelles approches pouvant conduire à l'élaboration de futures stratégies thérapeutiques pour le traitement de l'obésité et de ses pathologies associées.

12492 La combinaison de microbulles de gaz avec les ultrasons fournit des alternatives sans précédent pour la délivrance locale de molécules thérapeutiques dans le cerveau. L'oscillation des microbulles sous l'effet des ultrasons à proximité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), augmente transitoirement sa perméabilité et permet ainsi la pénétration des molécules thérapeutiques dans le cerveau. Si cette méthode a montré pleinement son efficacité à délivrer des molécules thérapeutiques dans le cerveau, l'innocuité de cette approche n'a pas été évaluée.

Dans ce contexte, nous évaluerons les conséquences neurophysiologiques de l'ouverture de la BHE par sonoporation chez le rat mâle. Les objectifs sont de:

- 1) Affiner les paramètres acoustiques permettant l'ouverture réversible de la BHE, qui sera objectivée par injection intraveineuse (i.v.) d'un colorant, le Bleu d'Evans.
- 2) Utiliser les paramètres acoustiques optimisés pour étudier les conséquences neurophysiologiques de l'ouverture de la BHE par des approches moléculaires et histologiques.

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

Remplacement: Dans une première approche expérimentale, nous avons mis en place et validé un dispositif expérimental permettant l'ouverture de la BHE chez le rat. Dans la continuité de ce projet, nous souhaitons aujourd'hui étudier les conséquences neurophysiologiques de l'ouverture de la

BHE. Par conséquent, à cette étape du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle d'étude in-vitro ou in-silico.

Réduction: Sur la base de nos études antérieures, notre étude nécessite 132 rats. Les groupes contrôles et expérimentaux seront constitués de 14 ou 15 rats. Nous réaliserons une étude statistique pour déterminer si l'ouverture de la BHE induit une accumulation du Bleu d'Evans, une variation d'expression des gènes exprimés dans le cerveau et des marqueurs moléculaires de processus neurologiques.

Raffinement: Les rats seront hébergés par groupe de 2 en présence d'un objet d'enrichissement (morceaux de carton). Les animaux seront observés une fois par jour. Les procédures expérimentales sous anesthésie générale et les animaux sont manipulés sur un tapis chauffant avec une restriction minimum de l'isolement social. Les animaux sont placés sous surveillance à leur réveil.

12493 Les anévrismes de l'aorte sont caractérisés par une dégradation de la paroi vasculaire conduisant à une dilatation et à une fragilisation des artères. La rupture brutale de l'aorte est alors létale et aucun traitement n'est pour le moment disponible pour ralentir la progression de la pathologie, en raison de connaissances insuffisantes sur les mécanismes impliqués. La protéase nexine-1 (PN-1) est un inhibiteur d'enzymes impliquées dans les modifications architecturales de la paroi vasculaire. Des publications antérieures ont montré que la PN-1 est produite en grande quantité dans la paroi des aortes malades chez l'homme et nous souhaitons comprendre son rôle dans l'évolution de la pathologie à l'aide d'un modèle animal. Pour cela, nous souhaitons comparer la formation des anévrismes aortiques dans 2 populations de souris : des souris produisant normalement la PN-1 et des souris modifiées par génie génétique et dont les cellules ne produisent plus la PN-1. Nous utiliserons sur chacune de ces populations de souris 2 modèles expérimentaux d'anévrismes. Le premier est un modèle chirurgical consistant à traiter l'aorte des souris par une enzyme qui la fragilise et induit la formation d'un anévrisme. Le deuxième est un traitement pharmacologique bien décrit dans la littérature scientifique. Celui-ci est basé sur l'administration de molécules qui fragilisent les artères et provoquent l'apparition de la maladie. Au total ce projet utilisera 360 souris sur une durée de 5 ans. La chirurgie sera pratiquée sous anesthésie et analgésie avec un suivi post-opératoire. Les animaux seront surveillés quotidiennement et les critères de traitement pour soulager l'animal et/ou les critères d'arrêt définis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance. En fin de procédure, les animaux seront euthanasiés afin d'analyser les tissus. Dans ce projet, la règle des 3R sera respectée. Nous raffinerons l'environnement des animaux par enrichissement de leur milieu de vie. Nous réduisons au maximum le nombre de souris utilisées, tout en nous assurant que les études réalisées nous permettent d'effectuer les analyses statistiques nécessaires. Des expériences ont été menées in vitro afin de remplacer autant que possible l'utilisation de ces animaux. Cependant, la complexité des mécanismes à l'origine des anévrismes requière l'utilisation d'un organisme complet.

12494 L'œdème est une affection caractérisée par une accumulation anormale de liquide interstitiel dans un tissu lésé. Il est localisé et inflammatoire : c'est une réaction de défense contre une agression. Il se produit quand il y a un déséquilibre des pressions hydrauliques et oncotiques dans le système de filtration entre le capillaire et les espaces interstitiels. Il en résulte un drainage des fluides présents dans le sang en direction des tissus environnants (extravasation). Il n'existe actuellement aucun traitement clinique efficace capable de contrôler le degré d'œdème. L'une des principales difficultés associées au développement d'une telle thérapie et à l'amélioration de notre compréhension de la physiopathologie de l'œdème est l'absence de méthode efficace pour surveiller de manière non invasive et mesurer avec précision le processus d'œdème. De plus, l'œdème peut être étudié au travers des mécanismes d'extravasation, les processus inflammatoires et de drainages lymphatiques. Ce projet va nous permettre de développer un modèle préclinique d'œdème cutané chez l'animal et de montrer l'activité pharmacologique de médicaments ou de dispositifs médicaux dans cette pathologie. Nous nous sommes en particulier appuyés sur la

publication suivante : Qin et al., Laser Med 2016. Assessment of edema volume in skin upon injury in a mouse ear model with optical coherence tomography.

La procédure 1 décrit l'induction d'un œdème cutané chez l'animal par une brûlure partielle et superficielle de la peau au moyen d'une goutte d'eau chaude déposée sur la zone d'intérêt. Cette technique sera développée pour s'affranchir d'autres techniques décrites pour être plus sévères : induction chimique ou induction thermique à l'aide d'une barre métallique chaude. Des rongeurs (souris, rats, cobayes), des lapins, ou des porcs pourront être utilisés en fonction des caractéristiques anatomiques et physiologiques de leur peau. Les méthodes d'observation des effets de la goutte chaude et de leurs disparitions seront l'imagerie macroscopique haute résolution et l'imagerie vasculaire non-invasive (caméra UHR C-Cube), la mesure de l'épaisseur de l'oreille (appareil de précision à pression constante). Une analyse en histopathologie viendra valider la présence de l'œdème par cette technique.

La procédure 2 décrit l'induction d'un œdème cutané chez l'animal comme décrit dans la procédure 1, et le traitement de la pathologie au moyen de candidats médicaments (administration topique ou systémique) ou au moyen de dispositifs médicaux. Les méthodes d'analyses seront identiques aux méthodes décrites dans la procédure 1. L'analyse histopathologique viendra également valider l'efficacité du traitement.

Le bénéfice médical attendu de ce projet est important car il va permettre de démontrer l'activité de médicaments ou de dispositifs médicaux dans des modèles de pathologies pour lesquelles les solutions thérapeutiques sont actuellement insuffisantes. La compréhension de la physiopathologie de l'œdème et son traitement passent par le développement de modèles précliniques non-invasifs et robustes qui permettent de récapituler son processus de formation et de résorption.

La réduction du nombre d'animaux est possible grâce à des procédures expérimentales adaptées : chaque animal est son propre témoin, il est suivi longitudinalement au cours du temps (mesures répétées). Une utilisation répétée des animaux est possible après une période de repos permettant une récupération complète entre chaque étude. Cette réutilisation est fonction de la taille d'une éventuelle biopsie qui serait nécessaire à une analyse en histopathologie.

Le raffinement des modèles animaux se traduit par l'utilisation d'une anesthésie générale lors de l'induction de l'œdème et par l'administration au préalable d'un analgésique par voie systémique afin d'éviter toute souffrance ou stress de l'animal. Les techniques d'évaluation non-invasives, en particulier l'imagerie, participent au raffinement des modèles animaux. Il est à noter que les acquisitions en imagerie non-invasives sont également réalisées sous anesthésie générale. De plus, la mise à disposition dans les cages d'enrichissement spécifique à l'espèce, permet d'améliorer le bien-être des animaux.

Sur la base d'une mise au point du modèle (Procédure 1, avec au maximum 75 rongeurs, 12 lapins ou 4 porcs) et de 10 études par an maximum (Procédure 2) incluant chacune en moyenne 25 rongeurs ou 12 lapins ou 4 porcs, un effectif maximal de 2141 animaux sur 5 ans sera nécessaire à la conduite de ce projet. Il est à considérer que les grandes espèces pourront être réutilisées dans ce même projet ou dans d'autres projets, si la taille d'une éventuelle biopsie qui serait nécessaire à une analyse en histopathologie était compatible avec une réutilisation de l'animal.

12495 Chez l'homme, le trouble panique est un trouble anxieux caractérisé par des attaques de panique récurrentes et sévères. Ces attaques de panique sont associées à un syndrome de détresse et une anxiété importante. Il s'agit d'événements courts et intenses, déclenchés par une cause soudaine. Lors de ces attaques, les patients présentent des symptômes tels que des dyspnées, de l'hypertension, des palpitations et des suées. Chez l'animal, il existe différents tests permettant d'évaluer les effets anxiolytiques des candidats médicaments. Parmi eux, le modèle d'attaque de panique induit par les ultrasons est basé sur le fait que l'application d'ultrasons, à une certaine fréquence et intensité, provoque des tentatives d'échappement et des symptômes apparentés à des attaques de panique chez l'animal (qui se traduisent par une augmentation de la fréquence cardiaque, de l'activité locomotrice et de la température corporelle).

Le projet consiste à évaluer la capacité de candidats médicaments à atténuer (voire à supprimer) les symptômes de l'attaque de panique chez des rats soumis aux ultrasons.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 500 rats sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets anxiolytiques d'une nouvelle molécule. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le rat est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

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

Raffinement : dans ce projet, le raffinement, utilisé pour réduire/éviter/limiter la souffrance des animaux, est obtenu par :

Le suivi quotidien de l'état de santé des animaux et leur suivi pondéral régulier, le suivi des signes cliniques et des points limites et le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire seront

Une médication adaptée post chirurgie ainsi qu'une période de récupération minimal de 10 jours afin de permettre une bonne récupération des animaux

Un personnel bien entraîné justifiant de compétences dans le domaine concerné (contention, chirurgie, etc)

Un monitoring du réveil des animaux après anesthésie gazeuse (si applicable)

. La validation du système de télémétrie et validation pharmacologique du modèle

. La détermination des points limites.

12496 La perception de la douleur est une expérience multidimensionnelle qui affecte le comportement, les émotions et les capacités à apprendre.

Il a été montré que la proopiomélanocortine (POMC), une substance produite par le cerveau, contrôle la transmission douloureuse. Les neurones impliqués dans cette transmission se trouvent dans la structure cérébrale appelée hypothalamus. Ces neurones sont aussi capables de fabriquer des beta endorphines qui sont de puissants antalgiques. Il a été récemment montré que ces neurones projettent dans la moelle épinière qui est une zone cruciale du contrôle des informations douloureuses.

Nous proposons ici d'étudier le rôle des neurones POMC sur la transmission de la douleur jusqu'à la moelle épinière.

Pour cela, nous proposons d'utiliser des souris transgéniques exprimant des neurones POMC fluorescents que nous stimulerons afin d'observer les conséquences de ces stimulations sur le comportement douloureux et l'activité électrique des neurones relais de la moelle épinière.

Le recours au modèle animal est indispensable car ce projet nécessite une évaluation comportementale.

La réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 20 souris transgéniques sans phénotype dommageable, au total.

Dans ce projet nous respecterons les 3R:

i) Réduction : la réduction du nombre d'animaux est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique (hétérogénéité inter-individuelle), le nombre de souris utilisées dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas 10 animaux. Nous ne pouvons donc pas travailler avec moins d'animaux ;

ii) Raffinement : les méthodologies utilisées dans ce projet impliquent la mise en œuvre de toutes les stratégies expérimentales et pharmacologiques disponibles actuellement pour réduire le nombre

d'animaux utilisés mais aussi minimiser les possibles effets délétères pour ceux-ci. Ainsi, nos mesures mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales impliquent une induction et suivi de l'anesthésie, une mise en place d'analgésie en pré et post-opération, une installation tout au long des procédures chirurgicales de contrôle de la température par tapis chauffant, avec un respect particulier de la notion de points limites adaptés à chaque procédure (critères d'interruption en cas de souffrance des animaux).

(iii) Remplacement : la transmission des signaux de douleur entre le système hypothalamique et la moelle épinière ne peut être étudié avec des modèles *in vitro* de cellules en culture, nous ne pouvons donc pas remplacer ce modèle animal.

12497 Le diabète de type 2 est une pathologie métabolique associée à des complications à long terme qui touche près de 3,5 millions de personnes en France. A ce jour, aucun traitement thérapeutique retardant l'apparition ou la progression de la maladie n'est disponible. L'IAPP (islet amyloid polypeptide) est une hormone co-sécrétée avec l'insuline par les cellules bêta des îlots pancréatiques (ou îlots de Langerhans). Dans le cas du diabète de type 2, l'agrégation et le dépôt d'IAPP induit la mort des cellules Bêta et la diminution de sécrétion d'insuline.

Un anticorps monoclonal humain cible sélectivement les agrégats pathologiques d'IAPP tout en épargnant la forme physiologique de la protéine. Les résultats démontrent que cet anticorps protège les cellules pancréatiques bêta de la toxicité induite par les agrégats d'IAPP *in vitro*. Il a été montré que l'administration de l'anticorps à des souris et rats transgéniques exprimant la forme humaine d'IAPP et développant spontanément un diabète de type 2 préserve également les cellules bêta et rétablit la sécrétion endogène d'insuline tout en ralentissant la progression du diabète. Cette approche thérapeutique basée sur l'action d'un anticorps contre la forme pathologique d'IAPP offre de nouvelles perspectives pour la prévention et le traitement du diabète de type 2.

Ce projet a pour but de démontrer l'efficacité de l'anticorps sur des îlots humains présentant des agrégats d'IAPP. Pour ce faire, des îlots pancréatiques humains provenant de donneurs obèses âgés ayant un risque accru de développer la pathologie seront implantés sous la capsule rénale de souris pré-diabétiques (car nourries avec un régime riche en graisse) traitées avec l'anticorps. L'efficacité de l'anticorps sera évaluée sur l'adaptation des îlots pancréatiques humains ainsi que sur leur capacité à ralentir la progression du diabète chez les souris greffées.

Pour ce projet, trois séries de greffe seront réalisées à partir de préparation d'îlots provenant de trois donneurs différents avec un total de 36 souris transplantées (18 contrôle/ 18 traités). Cela permettra une étude statistique satisfaisante.

Afin de respecter la règle des "3R", les animaux seront hébergés et traités avec soin (nourriture et eau en illimité, visite quotidienne, cycle jour/nuit régulier), avec anesthésie et traitement de la douleur lors de la chirurgie. De plus, cette chirurgie est réalisée par du personnel formé et sensible aux règles d'éthique expérimentale.

12498 Le cancer du poumon reste la première cause de mortalité par cancer dans les pays développés, avec plus d'un million de décès par an dans le monde. La chimiothérapie représente une facette essentielle dans la prise en charge des patients atteints de cette pathologie. Même si les traitements anticancéreux détruisent la très grande majorité des cellules pulmonaires tumorales, il est fréquent qu'une proportion d'entre elles résiste à leur action toxique, favorisant ainsi l'apparition de récidives et de métastases. Par ailleurs, la plupart des protocoles de chimiothérapie est responsable d'effets indésirables potentiellement graves, tels que des phénomènes toxiques sur les reins, et sont responsables d'une surmortalité des patients. Un des grands défis de la recherche actuelle sur le cancer du poumon est donc d'identifier (i) les mécanismes à l'origine de la résistance des tumeurs pulmonaires aux médicaments anticancéreux (ii) les mécanismes impliqués dans la survenue d'effets indésirables graves.

Ce projet de recherche concerne le cisplatine, l'anticancéreux de première ligne utilisé dans les cancers broncho-pulmonaires, et vise à identifier de nouveaux déterminants moléculaires à l'origine (i) de la résistance des tumeurs au cisplatine et (ii) des effets toxiques pour les reins induit par cette

molécule. Sur la base des résultats obtenus in vitro, il est nécessaire de poursuivre nos travaux à l'aide de modèles expérimentaux représentatifs de la pathologie humaine pour valider nos résultats. En particulier, les aspects chimiorésistance (Axe 1) et néphrotoxicité (Axe 2) nécessiteront l'utilisation de souris sauvages de type C57BL/6J et de souris modifiées génétiquement pour certains gènes d'intérêts.

Nous avons développé ce projet dans un souci de respect de la règle des 3R. Remplacer : Les processus étudiés dans ce projet mettant en jeu de nombreux types cellulaires, leur étude ne peut se concevoir que sur organisme entier et de ce fait nécessite de recourir à l'expérimentation animale.

Réduire : Les modèles utilisés dans ce projet sont complémentaires et utilisent des procédures déjà mises au point et couramment décrites. Les différentes procédures mises en œuvre pour ce projet ont été élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.

Raffiner : Le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Les techniques chirurgicales sont effectuées par du personnel habilité. Les animaux sont hébergés dans des cages enrichies avec des cotons de nidification. Une surveillance régulière des animaux est effectuée afin de détecter toute douleur ou souffrance éventuelle et des points limites pertinents ont été déterminés (perte de poids de 20%, volume tumoral atteignant 10% du poids de l'animal). Les prélèvements générant de l'inconfort sont réalisés sous anesthésie (xylazine /kétamine) ; les volumes et fréquences respectent le bien-être animal.

Le nombre total d'animaux estimé pour la mise en œuvre de ce projet est de 1099 souris, pour un projet d'une durée de 5ans.

Les résultats obtenus permettraient ainsi le développement de nouvelles modalités d'utilisation du cisplatine, un médicament anticancéreux de référence.

12499 Les benzodiazépines sont des molécules commercialisées depuis les années 60 pour leurs effets anxiolytique, myorelaxant, hypnotique et anticonvulsivant. Utilisées dans le respect des recommandations, en termes d'indications, de posologie et de durée de traitement, les benzodiazépines sont un outil indispensable à l'arsenal thérapeutique. Néanmoins, cette classe de molécules constitue un problème de santé publique devant leur surconsommation et le risque de mésusage, notamment chez les sujets âgés (≥ 65 ans) mis en évidence par le rapport de l'Agence Nationale de Sécurité du médicament. De plus, plusieurs études suggèrent un lien entre l'utilisation chronique de benzodiazépines et le risque de développer une démence de type Alzheimer. Les effets indésirables cognitifs, liés à une prise aiguë de benzodiazépines, ont bien été décrits chez l'Homme, notamment à de fortes doses ou en cas d'association à des hypnotiques. Cependant, leur responsabilité dans le développement de troubles cognitifs dégénératifs persistants après sevrage est encore débattue, et ce, malgré la réalisation de nombreuses études cliniques. L'anxiété pouvant être un symptôme précoce de la maladie d'Alzheimer, la prescription de benzodiazépine pourrait n'être qu'une conséquence et non la cause de la maladie. Or ce biais est difficile à évaluer chez l'Homme et l'étude des conséquences cognitives d'une administration chronique de benzodiazépines chez le volontaire sain âgé n'est pas envisageable d'un point de vue éthique. Ainsi, le recours à un modèle animal apparaît indispensable pour tenter de déterminer les effets propres de cette classe pharmacologique sur le cerveau et sur les fonctions cérébrales en lien avec la cognition.

L'usage chronique de benzodiazépines s'accompagne fréquemment de la prise d'alcool. Ces deux produits représentent les substances psychoactives les plus consommées chez le sujet âgé. Or, on sait que ces deux substances partagent des propriétés pharmacologiques communes, avec notamment une action sur la balance GABA/glutamate, encore appelée balance inhibition/excitation. Le maintien de l'équilibre entre ces deux neurotransmetteurs est essentiel aux processus de mémorisation. On sait que la consommation chronique d'alcool peut être à l'origine de troubles cognitifs encore appelés « trouble cognitif lié à l'alcool » avec trois niveaux de sévérité :

léger, modéré ou sévère, ce dernier niveau incluant le syndrome de Korsakoff. On peut alors se demander dans quelle mesure une poly-consommation alcool/benzodiazépine peut favoriser la genèse de troubles cognitifs neurodégénératifs.

L'objectif de ce travail est donc d'étudier l'impact fonctionnel et anatomopathologique d'une prise chronique de benzodiazépines et/ou d'alcool chez la souris. Nous allons également évaluer l'impact de l'âge et du sexe qui pourraient être des facteurs déterminant dans l'émergence des dommages cérébraux.

Pour cela, nous utiliserons 240 souris C56Bl/6 (120 mâles et 120 femelles), âgées de 6 ou 12 mois. Ces souris seront réparties en 4 groupes : un groupe recevant du diazépam, un groupe recevant éthanol + diazépam, un groupe recevant de l'éthanol et un groupe contrôle. Le groupe diazépam sera traité pendant 16 semaines à l'aide de croquettes supplémentées en diazépam. Le groupe diazépam + éthanol sera traité pendant 16 semaines à l'aide de croquettes supplémentées en diazépam et de biberon d'éthanol. Le groupe éthanol sera traité par biberon d'éthanol. Nous réaliserons une première série de tests comportementaux après 8 semaines de traitement pour évaluer en aigu l'effet du diazépam et/ou de l'éthanol. A l'issue des 16 semaines de traitement, après une période de sevrage de 7 jours nous réaliserons une seconde série de tests comportementaux, afin de rechercher des troubles cognitifs dégénératifs persistants après arrêt de la prise de benzodiazépines et/ou d'alcool. Parallèlement à l'évaluation comportementale, une étude d'imagerie in vivo, en spectroscopie par résonance magnétique (SRM) sera réalisée en cours de traitement et à distance de l'arrêt du traitement. La SRM est une technique non invasive qui permet une quantification de messagers chimiques cérébraux, dont l'équilibre participe au maintien des fonctions cognitives. A noter que deux dosages sanguins d'éthanol et de diazépam seront réalisés à 8 semaines et à 16 semaines de traitement pour vérifier la stabilité de la concentration plasmatique en diazépam. Enfin, à l'issue des évaluations comportementales, les animaux seront euthanasiés et l'impact physiopathologique sur les structures cérébrales sera évalué par une analyse histologique post-mortem.

La réalisation de SRM in vivo permet de limiter l'utilisation d'animaux puisqu'elle permet une quantification en temps réel, à la place d'un dosage post mortem qui demanderait plus d'animaux (Remplacement). De la même façon, les souris évaluées par les tests de comportement et par l'étude en SRM seront utilisées pour l'étude histologique post-mortem (Réduction). Par ailleurs, un suivi quotidien des animaux sera effectué pour surveiller l'apparition éventuelle de souffrance ou de points limites pour lesquels des décisions adaptées de traitement analgésiques voir d'euthanasie seront prises (Raffinement).

12500 La rate est l'organe intra-abdominal le plus souvent lésé lors des traumatismes abdominaux fermés. En cas d'hémorragie, la chirurgie immédiate avec ablation de l'organe est indiquée, mais chez les patients hémodynamiquement stables, un traitement non chirurgical avec embolisation artérielle permet d'améliorer le taux de sauvetage de l'organe tout en évitant les complications post-opératoires associés et réduit également le risque d'hémorragie secondaire. L'embolisation consiste à guider un cathéter dans les vaisseaux jusqu'au site hémorragique puis injecter un produit qui va occlure les artères responsables du saignement. On utilise fréquemment des particules de gélatine résorbables pour boucher les vaisseaux.

Les agents d'embolisation sont des dispositifs médicaux dont la mise sur la marché est soumise à l'obtention du marquage CE pour l'Europe et l'obtention d'une autorisation de la Food and Drug Administration pour les Etats-Unis.

L'objectif du projet est d'évaluer l'efficacité d'hémostase par embolisation de l'artère splénique avec des particules résorbables ou non résorbables dans un modèle d'hémorragie de la rate chez le porc.

Les essais réalisés feront partie d'un dossier de marquage CE soumis à un Organisme Notifié européen et d'un dossier d'équivalence 510(k) pour la soumission à la Food and Drug Administration américaine.

L'étude est comparative, c'est-à-dire qu'elle compare deux types de particules de gélatine résorbables à des particules polymériques non résorbables déjà disponible sur le marché et administré selon la même procédure.

L'étude portera sur un nombre maximum de 30 animaux. Les animaux étudiés dans ce projet proviennent de centres agréés et sont nés/élevés en captivité.

La présente demande décrit l'induction de lésions hémorragiques de la rate chez le porc, le traitement des lésions créées par embolisation artérielle et l'évaluation de l'efficacité du traitement par imagerie et histologie.

Principe des 3R :

- Remplacement : Les études préliminaires de dégradation et de cytotoxicité des matériaux constitutifs du dispositif peuvent être réalisées in vitro sur des cultures de cellules. Les essais concernant l'efficacité ou les effets locaux du traitement ne peuvent en revanche être effectués que sur des modèles in vivo, se rapprochant le plus possibles des conditions finales d'utilisation des produits.
- Réduction : L'estimation du nombre d'animaux utilisé est principalement basée sur le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente des données et limiter la variabilité inter-individus. Ce nombre est au minimum de 3 animaux par groupe d'étude (Norme ISO-10993-6). Quand cela est possible, les données de groupes contrôle sont constitués par des groupes d'animaux "historiques" pour lesquels ces données sont déjà disponibles.
- Raffinement : La procédure d'induction d'hémorragie et d'embolisation splénique est réalisée sous anesthésie générale par du personnel formé et expérimenté. Un protocole de suivi des animaux et de prise en charge de la douleur, avec évaluation quantitative des paramètres de suivi pour définir le point limite, sont utilisés bi quotidiennement afin de réduire au maximum la douleur et la souffrance animales.

12501 L'arrêt cardiaque ou mort subite, responsable de 50000 décès potentiellement évitables par an en France est une problématique importante de santé publique. Actuellement, on estime que moins de 10% des victimes d'arrêt cardiaque réanimées survivent sans séquelles cérébrales majeure. Le pronostic des patients réanimés avec succès reste largement conditionné par la sévérité des lésions au cerveau (souvent irréversibles) et de la défaillance du cœur consécutives à l'arrêt suivi de la reprise de la circulation sanguine. En effet, l'arrêt cardiaque diminue de manière critique l'apport en oxygène aux cellules ce qui endommage les organes vitaux ou en altère gravement le fonctionnement en seulement quelques minutes. Aucune intervention pharmacologique n'a montré son efficacité pour prévenir ces lésions cérébrales ou l'atteinte cardiaque et ainsi améliorer favorablement le pronostic des patients. Il apparaît donc urgent de tester de nouvelles approches thérapeutiques dans cette affection fréquente.

Récemment, des études réalisées chez l'Homme ont rapporté des effets bénéfiques du lactate de sodium semi-molaire (un médicament utilisé depuis des décennies chez l'homme notamment dans certaines intoxications médicamenteuses) pour améliorer la fonction du cœur (capacité à se contracter et à distribuer le sang) après une chirurgie cardiaque ou lors d'une poussée d'insuffisance cardiaque ou encore pour protéger le cerveau après un traumatisme grave. Ces effets protecteurs pourraient s'appliquer au contexte de l'arrêt cardiaque.

Nous envisageons donc de tester ce médicament chez des lapins soumis à un arrêt cardiaque puis réanimés en suivant les recommandations en vigueur chez l'homme (massage cardiaque, injection d'adrénaline, administration d'oxygène). Il n'existe malheureusement pas d'alternative à l'expérimentation animale pour ce type de recherche. Le lapin est un animal largement utilisé pour l'étude de stratégies visant à protéger le cœur et le cerveau des conséquences de la privation transitoire d'oxygène, avec des résultats généralement transposables à l'homme. Par ailleurs, cette espèce permet d'utiliser du matériel développé pour la réanimation de l'enfant et de réaliser des prélèvements itératifs de sang sans compromettre la survie de l'animal, ce qui n'est pas possible chez des animaux plus petits comme le rat ou la souris. Les expérimentations se feront sous anesthésie générale pour éviter toute douleur ou stress de l'animal. Les animaux ne seront jamais

réveillés et seront donc euthanasiés alors qu'ils seront toujours sous anesthésie générale. Le modèle d'arrêt cardiaque utilisé, validé antérieurement par un Comité d'Ethique de recherche expérimentale et par plusieurs publications scientifiques de haut niveau, est parfaitement maîtrisé dans notre laboratoire (ce qui permet de limiter au maximum le nombre d'animaux impliqués dans la recherche). Afin de démontrer l'effet protecteur du lactate de sodium, 42 animaux au maximum seront utilisés pour l'étude. La durée des expérimentations ne devrait pas excéder 12 mois. Si le traitement s'avère efficace chez l'animal, on proposera de tester cette intervention pharmacologique chez l'Homme dans le cadre d'un essai clinique. Les expérimentations animales chercheront également à mieux comprendre comment le lactate de sodium agit pour protéger les cellules qui ont été privées transitoirement d'oxygène.

12502 Les plaquettes sanguines jouent un rôle clef dans l'arrêt du saignement. Suite à une lésion vasculaire elles adhèrent à la paroi lésée pour former un clou hémostatique qui stoppe les saignements. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus ont été clairement identifiés.

Les plaquettes participent également au maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation dans des organes tels que la peau, le poumon ou le cerveau. Ceci a été démontré par le fait que l'absence de plaquettes (thrombopénie) induit des saignements au niveau d'un site présentant une inflammation. A ce jour, les mécanismes moléculaires mis en jeu restent obscurs et il a été proposé ces mécanismes différents de ceux de l'hémostase primaire.

Comprendre le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire et dans l'arrêt du saignement au niveau du site inflammatoire peut avoir des applications pour soigner des patients qui présentent des saignements lors d'une inflammation.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'importance d'une classe de récepteurs plaquettaires appelés les intégrines qui sont impliqués dans l'adhérence et l'activation des plaquettes. Pour cela des animaux seront soumis à un modèle d'inflammation cutanée induite par une réaction antigène – anticorps et à un modèle d'inflammation cérébrale induite par ischémie – reperfusion d'une artère cérébrale, deux modèles générant une inflammation locale.

Remplacement

Le but de ce projet est d'évaluer le rôle des intégrines plaquettaires dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors de réactions inflammatoires.

Le phénomène d'Arthus est une réaction d'hypersensibilité concernant essentiellement les vaisseaux sanguins, les membranes séreuses (thorax, abdomen, plèvre), le péricarde et la membrane synoviale. Les modèles *in vitro* ne sont pas assez sophistiqués pour appréhender toute la complexité générée par ces phénomènes intégrés.

De la même façon l'accident vasculaire cérébral est un processus particulièrement complexe faisant intervenir plusieurs types cellulaires ainsi que des conditions hémodynamiques, il nous semble impossible de substituer la souris par des modèles *in vitro*.

Réduction

Le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 16 souris/groupe pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

Raffinement

L'utilisation de modèles d'animaux a été établie en raffinant au maximum les conditions de travail, afin de limiter leur angoisse, stress et douleur lors des manipulations. Pour ce faire, des points limites ont été établis pour les procédures décrites. Ces points limites permettront de soustraire l'animal aux procédures expérimentales permettant de limiter la souffrance et l'inconfort de l'animal.

Pour assurer leur confort, les animaux sont hébergés dans des cages munies de particules de bois et enrichies avec un carré en coton compressé et de frisure de papier, afin de permettre aux animaux de réaliser un nid et de compartimenter leur environnement conformément à leurs besoins comportementaux.

Pour chaque procédure, les animaux sont anesthésiés, maintenus à une température de 38°C par l'utilisation d'une plaque chauffante (tout au long de la procédure) et un traitement approprié contre la douleur leur est administré.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 256 souris.

12503 La tuberculose pulmonaire humaine, causée par la bactérie intracellulaire *Mycobacterium tuberculosis*, fait encore partie au 21^{ème} siècle des dix principales causes de décès dans le monde. En 2015, 1,8 million de décès et 10,4 millions de nouveaux cas d'infection ont été enregistrés par l'Organisation Mondiale de la Santé. La fréquence du succès du traitement de la tuberculose par des antibiotiques est de 83% mais se réduit à seulement 52% dans le cas de la tuberculose multi-résistante dont l'incidence est en hausse (4,6% parmi les nouveaux cas de tuberculose en 2015).

En terme de prévention, le mutant atténué de *Mycobacterium bovis*, Bacille de Calmette et Guérin (BCG), est actuellement le seul vaccin anti-tuberculeux. Administré essentiellement à la naissance pour la prévention dans les zones endémiques, il n'y confère qu'une très faible protection contre la tuberculose pulmonaire d'adulte. La faible efficacité du BCG a été attribuée: (i) au déclin progressif des réponses immunitaires à partir de 10 ans post-vaccination, (ii) à l'induction de faibles réponses contre les antigènes associés à la latence, et (iii) à l'absence d'induction de réponses spécifiques des antigènes de *M. tuberculosis* que le BCG n'exprime pas.

Deux catégories de vaccins anti-tuberculeux sont actuellement en développement: (A) les vaccins vivants atténués, qui auront pour vocation de remplacer le BCG, et (B) les vaccins sous-unitaires, essentiellement en vue d'immunisation de rappel à l'âge adulte. Notre projet vise à approfondir le potentiel vaccinal de nouveaux candidats vaccins anti-tuberculeux appartenant à chacune de ces catégories, et développés par nos laboratoires, contre la pathologie pulmonaire médiée par *M. tuberculosis* dans le modèle préclinique de souris.

Ce projet fera emploi de:

A) Deux nouveaux vaccins vivants atténués:

A1) Une souche de BCG recombinante complétée par la région chromosomique dite «ESX-1» du pathogène aquatique *Mycobacterium marinum* (BCG::ESX-1Mmar) et qui présente une immunogénicité et une capacité protectrice supérieure au BCG, et

A2) Une souche de *M. tuberculosis* portant une délétion génétique de la région dite «ppe25-pe19» (*MtbΔppe25-pe19*), ce qui lui confère un phénotype atténué, tout en lui préservant une grande immunogénicité.

B) Des vaccins candidats sous-unitaires constitués d'un vecteur lentiviral portant des séquences codant pour des antigènes qui s'expriment à différents stades de l'infection par *M. tuberculosis*.

Nous évaluerons la capacité protectrice d'une vaccination de type «prime» (primo-immunisation) avec des candidats vaccins vivants atténués, suivi d'une vaccination de type «boost» (immunisation de rappel) par des vecteurs lentiviraux. Des souris non vaccinées ou vaccinées seront ensuite soumises à l'épreuve par une faible dose ($1-5 \times 10^2$ CFU/souris) de *M. tuberculosis* par aérosol afin de mimer l'infection telle qu'elle se produit chez l'homme. L'efficacité vaccinale sera évaluée chez ces animaux 5 à 10 semaines post infection par des analyses microbiologiques, immunologiques et histopathologiques.

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

En vue de « Raffiner » nos expériences, chez les souris infectées par *M. tuberculosis*, une surveillance sera mise en place 2 fois par semaine à partir d'un mois après le challenge par *M. tuberculosis*. Cette surveillance sera assurée par le concepteur du projet ou les chercheurs contractuels qui travaillent sur ce projet. La surveillance sera également assurée par les techniciens animaliers, en charge de nettoyer les cages et qui sont présents dans l'espace de l'animalerie tous

les jours. La cage des souris comportera, comme élément d'enrichissement, du coton dentaire, pour que les animaux puissent construire un nid. Nous avons défini des points limites de façon à euthanasier les animaux qui les atteignent et limiter ainsi la souffrance animale.

Afin de « Réduire » le nombre d'animaux utilisés, en nous basant sur des analyses statistiques, nous avons planifié d'inclure le nombre minimal d'individus/groupe expérimental qui permette une analyse statistique pertinente et concluante. Le nombre estimé d'animaux utilisés dans ce projet est de 516 (mâles ou femelles, de 6 à 20 semaines d'âge), inclus dans une deux procédures expérimentales de sévérité légère.

Aucun modèle in vitro ne permet à ce jour d'étudier la pathogénèse à l'infection par *M. tuberculosis* et la vaccination contre cette infection. La stratégie de « Remplacement » consiste ici à utiliser le modèle souris, car cette espèce est relativement résistante à l'infection par *M. tuberculosis*, ce qui minimise la souffrance animale tout en évitant l'utilisation d'animaux de plus grande taille et de plus grande sensibilité, tel que le cobaye.

12504 La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une stratégie thérapeutique majeure afin de combattre plusieurs pathologies hématologiques malignes et non malignes. Plus de 80000 procédures de transplantation de CSH sont effectuées chaque année dans le monde entier, en particulier pour la leucémie, les lymphomes, les syndromes myélo-prolifératifs et myéloplasiques. Puisque la procédure implique un conditionnement qui élimine le système hématopoïétique, les patients rencontrent une immunodéficience sérieuse après une greffe de CSH qui les rend très vulnérables aux infections bactériennes, fongiques et virales, avant que la moelle osseuse du nouveau donneur ne commence à produire suffisamment de nouvelles cellules effectrices immunitaires. Bien que des améliorations ont été apportées dans la prise en charge des infections, elles sont encore à l'origine de 30 % des décès après transplantation. Le développement de nouvelles stratégies préventives contre les infections basées sur une reconstitution plus rapide de l'immuno-compétence permettrait d'éviter ces décès et d'étendre l'utilité de la transplantation de CSH à d'autres pathologies. Étant donné le manque d'options thérapeutiques satisfaisantes, le développement de nouvelles thérapies répond à un besoin clinique clair et urgent, tant pour les traitements aigus que prophylactiques.

Nous avons observé précédemment que la cytokine myéloïde M-CSF, également libérée lors d'infections, pouvait être produite en cas d'urgence afin de stimuler la production accrue de cellules myéloïdes pour combattre l'infection. Nous voulons démontrer que cet effet a un bénéfice thérapeutique après une transplantation de CSH en améliorant la protection contre les infections bactériennes, fongiques et virales comme les pathogènes opportunistes cliniquement pertinents : *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* et CMV (Cytomegalo Virus), respectivement. Nous utiliserons un modèle murin préclinique de transplantation de CSH et nous infecterons des souris avec différents pathogènes pour cette étude.

La règle des 3R sera respectée dans ce projet :

Remplacement: Dans l'impossibilité d'obtenir des échantillons de cellules souches hématopoïétique de moelle osseuse d'humains (nécessitant des prélèvements invasifs), l'utilisation de modèles animaux est indispensable. Ne pouvant donc pas remplacer le modèle murin, nous réduirons autant que possible leur utilisation.

Réduction : Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux pour chaque groupe, nécessaire à la réalisation d'un test statistique paramétrique, soit un total de 1962 souris mâles et femelles. La surveillance journalière des animaux en expérimentation nous permet de définir un point limite selon les signes extérieurs de souffrance : léthargie, poil hérissé, comportement asocial, dos courbé, animal se déplaçant difficilement, perte de poids supérieur ou égale à 20% de son poids initial: L'atteinte d'un de ces points limites entraînera la décision d'euthanasie des animaux concernés.

Raffinement: Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subie par les souris afin d'obtenir des données qui soient le moins biaisées possible par le "mal-être" de l'animal. Une anesthésie générale sera utilisée durant les procédures expérimentales (prélèvement sanguin et transplantation). Nous vérifierons

l'état de santé des souris quotidiennement : tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation) sera relevé et évalué grâce à une grille d'évaluation de la douleur. Lorsque les souris présenteront une perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids maximum ou si le score de la grille de douleur atteint 10-12, soit le cas sévère, les animaux seront alors euthanasiés.

Durant l'ensemble de l'étude, les souris seront hébergées dans des conditions conformes à la réglementation européenne en vigueur (environnement contrôlé : température et ventilation régulées, lumière avec un cycle de 12h, hygrométrie), avec un accès continu à la nourriture et à l'eau. Les souris seront maintenues en groupes de 3 à 5 animaux par cage. L'environnement est enrichi par des dômes en carton ou du coton.

12505 La prise en charge thérapeutique des atteintes cancéreuses de la prostate représente un enjeu clinique majeur. Elle est assujettie à une compréhension détaillée des mécanismes cellulaires et moléculaires qui animent ces lésions tumorales chez l'Homme. Comme de nombreux processus cancéreux, la tumorigénèse des cellules de la prostate est complexe et ne résultent généralement pas de mutations uniques mais d'altérations géniques multiples. La complicité de ces mécanismes rend difficile et limite la modélisation des cancers prostatiques in vitro par la seule étude des modèles cellulaires dont nous disposons actuellement. L'utilisation de modèle murin génétiquement modifié a déjà permis de souligner plusieurs interactions moléculaires dont la dérégulation semble importante dans les cancers de la prostate. C'est le cas des gènes Men1 et PTEN dont la perte favorise individuellement le développement des lésions tumorales de la prostate. Notre projet vise à comprendre la synergie de transformation qui existe entre le gène MEN1 et la voie de signalisation de la protéine PTEN. Afin de comprendre l'importance des interactions de ces 2 protéines, nous allons générer et étudier des souris génétiquement modifiées qui n'expriment plus un ou ces deux gènes dans les cellules de la prostate. Nous génèrerons 3 cohortes de souris male présentant les différentes combinaisons de mutations. Ces cohortes seront analysées au 2eme, 6eme et 12eme mois d'âge où sont respectivement détectées des lésions pré-néoplasiques, des adénocarcinomes et des adénomes métastatiques.

Nos travaux suivront le principe des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Approche de raffinement : les animaux de ses cohortes seront suivis attentivement et individuellement afin de collecter un maximum d'information sur l'apparition des lésions tumorales tout en limitant l'apparition d'éventuels signes de souffrances. Le bien être des souris sera aussi assuré grâce à une définition précise des points limites et une surveillance adaptée. Stratégie de remplacement : La génération de lignées cellulaires et d'une banque de tissus histologiques dérivée de ces modèles nous permettra également de limiter l'utilisation à venir de modèles murins tout en assurant la progression de nos travaux au travers de leur utilisation. La collection d'échantillons tumoraux permettra également la mise en place d'études à haut débit qui facilitera l'identification de nouvelle cible thérapeutique au laboratoire. Approche de réduction : signalons enfin que la fréquence connue de ces lésions nous permettra de limiter le nombre d'animaux nécessaire tout en assurant la validité statistique de nos données et leur interprétabilité. Ce projet nécessitera 174 souris.

12506 L'incapacité de ralentir la progression de maladies neurodégénératives presse au développement de nouvelles approches thérapeutiques. Notre étude sera basée sur le potentiel neuroprotecteur et neurorestorateur des lysats plaquettaires pour le traitement de maladies neurodégénératives, notamment la maladie de Parkinson (MP) et la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Le lysat plaquettaire (platelet pellet lysate, PPL) est un acteur majeur de notre système physiologique de réparation/cicatrisation. En effet, plusieurs études ont montré l'impact majeur des lysats plaquettaires, qui contiennent un très grand nombre de facteurs de croissance, en médecine régénérative (grands brûlés, escarre, nécrose osseuse et cutanée...). Nombre de ces facteurs sont d'ailleurs impliqués dans le développement, le maintien et le bon fonctionnement du système nerveux central et périphérique. Des résultats in vitro ont montré que les PPL présentent un fort pouvoir neuroprotecteur sur des cultures de neurones dopaminergiques ou de motoneurones

présentant un fort stress oxydant induit par différents toxiques afin de modéliser la MP et la SLA respectivement.

Le présent projet vise donc à évaluer l'effet protecteur des PPL obtenus par différentes préparations, dans 3 modèles de souris: la souris intoxiquée au MPTP et la souris lésée unilatéralement à la 6-OHDA, modèles de la MP et la souris transgénique SOD1, modèle de SLA. Un total de 1345 souris sera utilisé au maximum dans ce projet.

Les effets attendus des PPL sont :

- i. Une amélioration des fonctions motrices et comportementales dans les différents modèles
- ii Une neuroprotection et/ou une neurorestauration des neurones dopaminergiques (modèle MPTP et modèle 6-OHDA) et des motoneurons (modèle SOD1) qui dégénèrent respectivement dans la MP et la SLA.

Les préparations de PPL seront testées et leur mode d'action étudiés sur les cultures cellulaires disponibles au laboratoire avant d'être utilisés chez l'animal (Remplacement). Nous veillerons à réaliser des études comportementales et histologiques sur les mêmes animaux quand cela est possible (Réduction). Par ailleurs, les conditions d'hébergement seront optimisées et un suivi quotidien des animaux sera effectué pour surveiller l'apparition éventuelle de souffrance ou de points limites pour lesquels des décisions adaptées seront prises (Raffinement).

12507 Résumé non technique

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies malignes qui touchent près de 3/100 000 personnes par an en France. Elles se caractérisent par un blocage de maturation des précurseurs hématopoïétiques et leur prolifération excessive dans la moelle osseuse. Le traitement actuel repose sur une chimiothérapie visant à réduire la masse des cellules leucémiques et qui conduit dans 50 à 80 % des cas à la rémission complète selon l'âge des patients traités et le type de LAM les affectant. Cependant, la monothérapie par l'Imatinib ou des inhibiteurs plus puissants peut aboutir une rechute à plus ou moins long terme chez certains patients liés à l'échec de l'éradication de la maladie résiduelle composée de cellules résistantes aux drogues utilisées. Le laps de temps pendant lequel des cellules tumorales persistent chez l'hôte sur une longue période de temps sans proliférer est appelée dormance tumorale. Cette dormance est fréquemment rencontrée dans les pathologies oncohématologiques et certains lymphomes peuvent persister chez l'hôte en rémission partielle ou complète de nombreuses années avant rechute. Des cellules résiduelles peuvent effectivement être trouvées chez ce type de patients leucémiques ayant eu des traitements de type chimiothérapies, immunologiques (allogreffe, anticorps monoclonaux), ou inhibiteurs ciblés (Imatinib, Dasatinib). Les mécanismes mis en jeu pendant cette phase de persistance de la maladie leucémique chez un patient en situation de rémission complète, et plus généralement au cours des affections néoplasiques sont très mal connus. La compréhension du phénomène de persistance des cellules tumorales à l'état de dormance peut donc conduire à de nouvelles stratégies de prévention de la rechute.

Des expériences de déméthylation de gènes dans un modèle cellulaire murin de leucémies a montré l'importance du ripoptosome dans ce modèle. Des études faites sur les blastes CD34+ de patients leucémiques montrent que cette voie est impliquée et valide notre modèle murin. La voie de signalisation impliquée passe par le clivage d'un facteur de transcription par une caspase. De plus, la surexpression du mutant non clivable par la caspase rétablit in vitro la survie cellulaire dans ce modèle.

Objectifs

Le but primaire du projet est de comprendre les mécanismes impliqués par les mutations du facteur de transcription sur la tumorigénicité des cellules leucémiques et de traiter les animaux avec un médicament. En effet, sur la quarantaine de molécule testées in vitro, seule l'une d'elle, déjà utilisée chez les patients, permet d'entraîner la mort des cellules d'un des mutants. Son rôle sur la dormance tumorale et la rechute à long terme n'est pas connu.

Le but secondaire est d'avoir une signature de la dormance tumorale en utilisant les animaux injectés et traités ou non survivants à long terme pour analyser la dormance tumorale et en comprendre les bases génétiques, épigénétiques et transcriptomiques.

Avantages et inconvénients

Inconvénients: Pour construire le modèle cellulaire, nous avons été dans l'obligation d'insérer un gène codant une protéine fluorescente rouge car les techniques de dépistage des cellules souches par voie enzymatique impliquent l'utilisation du composé commercial unique qui fluoresce dans le vert. Si nous avons une expertise pour des cellules génétiquement modifiées exprimant une protéine fluorescente verte, celles qui fluorescent dans le rouge ne nous sont pas connues. Il nous faudra donc tester différentes concentrations pour vérifier la prise de greffe et la leucémogénèse dans ce modèle.

La molécule utilisée chez les patients est déjà employée sur des souches murines différentes de celles que nous utilisons. Nous nous servons cependant de ces informations comme base (à deux concentrations différentes) pour l'utiliser dans notre modèle.

Avantages: Nous utilisons un modèle murin syngénique de leucémie myéloïde qui récapitule la pathologie humaine. Ce modèle permet de tester rapidement la validité des résultats obtenus in vitro, en faisant des groupes qui permettent d'obtenir des valeurs statistiques correctes avec un nombre de souris restreint.

Pour les essais, nous avons prévu d'utiliser des groupes de cinq souris pour les trois concentrations cellulaires et les deux doses de médicament utilisés avec un contrôle véhicule commun, soit soixante souris.

Pour l'expérience proprement dite, nous utiliserons des groupes de 10 souris injectées par les lignées traitées ou non aux concentrations déterminées lors des essais, soit soixante souris. Un second groupe de soixante souris sera en fonction de la validité statistique de la première expérience. En effet, les animaux survivants à long terme, dont le nombre est aléatoire, seront utilisés pour un projet de signature de la dormance tumorale, ce qui limitera les expériences supplémentaires.

Conformité avec les exigences de la règle des 3 R

Réduire: Nous avons testé in vitro plus de 40 molécules. Une seule d'entre elles le sera sur le modèle animal. Le protocole est écrit et comprend trois parties: une phase d'essai, l'expérience proprement dite ainsi qu'une étude à long terme sur les animaux survivants. Le nombre total d'animaux utilisé sera de 180. Nous profiterons de la survie des animaux restants pour effectuer une étude sur la dormance tumorale.

Raffiner: Le modèle utilisé est un modèle syngénique qui récapitule la pathologie humaine. Le point limite principal est connu et est atteint d'un jour sur l'autre avec prostration et pelage hérissé au bout de 30 à 50 jours selon la quantité de cellules injectées. Il ne sera pas donné d'analgésiques pour éviter la souffrance animale pour éviter d'interférer avec la molécule injectée. Cependant, la fuite ou l'agressivité des animaux au moment de l'injection de la molécule seront considérées comme point limité de souffrance et les traitements seront arrêtés. Les résultats seront analysés statistiquement par la méthode de survie de Kaplan-Meier.

Remplacer : Toutes les études sont préalablement effectuées in vitro. Seules, les molécules les plus intéressantes (dans ce projet, une seule) sont testées in vivo dans le modèle syngénique qui permet une étude dans des conditions réelles.

12508 La maladie d'Alzheimer est une maladie évolutive représentant la forme la plus connue de démence. Elle se caractérise par des pertes de mémoire, une diminution des capacités intellectuelles et la perte progressive de réponses adaptées à la vie quotidienne. En France, plus de 200 000 cas de maladie d'Alzheimer ou autre forme de démence sont diagnostiqués par an. Cette maladie n'est pas un processus normal de vieillissement : jusqu'à 5% des personnes atteintes peuvent en souffrir dès l'âge de 40-50 ans. En moyenne, la survie des personnes atteintes est de 8 à 10 ans. Actuellement, la maladie d'Alzheimer est totalement incurable. Ce qui apparaît important à ce jour

est de retarder l'apparition des symptômes et d'empêcher le développement de cette pathologie par une compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués. L'apparition de plaques, dues à des dépôts excessifs de fragments d'une protéine bêta-amyloïde, est un facteur majeur à l'origine de la dégradation et de la dégénérescence des neurones. Ce phénomène, sur lequel on ne peut encore agir, intervient en premier lieu dans les structures impliquées dans la mémoire, puis s'étend à d'autres régions cérébrales. Analyser dans un contexte de cerveau vivant le développement de neurones humains exposés à la forme humaine de la protéine bêta-amyloïde, représente une étape majeure pour décrypter les mécanismes cellulaires altérés dès le développement et pour trouver des pistes thérapeutiques efficaces. Une réduction importante de l'activité cholinergique a été une des premières composantes physiopathologiques identifiée dans la maladie d'Alzheimer à partir d'études post-mortem. Une cible particulière pour des composés thérapeutiques est le récepteur nicotinique humain de l'acétylcholine. En effet, de récentes études publiées au laboratoire démontrent son interaction avec la protéine bêta-amyloïde. Dans son ensemble, ce projet devrait permettre de grandes avancées dans le domaine de la maladie d'Alzheimer et aussi plus généralement des maladies neurodégénératives.

Le projet implique l'utilisation de précurseurs neuronaux humains reprogrammés à partir de cellules souches pluripotentes induites, greffés in utero chez la souris. Ces neurones humains exprimant ou non différentes formes polymorphes des récepteurs nicotiniques seront réimplantés in utero dans la zone ventriculaire du cerveau des embryons de souris. L'intégration des neurones, leur développement, les connexions synaptiques qu'ils établissent seront analysées morphologiquement et en imagerie fonctionnelle. L'injection in utero évitera l'utilisation de souris immunodéficientes et de conditions difficiles d'élevage et de survie de portées. A l'âge adulte, les souris greffées seront injectées dans une région ciblée du cerveau avec un vecteur lentiviral induisant l'expression accélérée de la forme humaine de la protéine bêta-amyloïde. Cette étape permettra d'évaluer son impact sur les circuits neuronaux d'origine humaine et leur survie.

Ce projet comporte trois procédures expérimentales de sévérité modérée et une procédure sévère avec analyse parallèle de tissus de cerveaux de souris en post-mortem et analyse in vivo de l'activité neuronale et de connectivité. Les souris transplantées in utero par précurseurs de neurones humains, puis exposées ou non à la forme humaine de la protéine bêta-amyloïde seront étudiées sur une période de 2 à 9 mois. Au total, 740 souris Swiss OF1 seront utilisées sur 5 ans.

Des mesures seront mises en place pour supprimer ou limiter les effets dommageables pour les animaux. Les opérations chirurgicales seront menées sous anesthésie générale. Elles seront suivies d'une période de surveillance quotidienne de l'état général avec recours à des antalgiques, autant que nécessaire. Des points limites sont définis, et s'ils sont atteints et/ou que les traitements par analgésiques s'avèrent inefficaces, les animaux seront mis à mort.

Le recours à l'animal est nécessaire car l'objectif de cette étude est d'analyser le développement des cellules humaines in vivo, dans un environnement le plus proche possible des conditions rencontrées chez des individus atteints de la maladie d'Alzheimer, et leur intégration dans l'architecture complexe du cerveau. Grâce à des outils statistiques, nous avons déterminé le nombre d'animaux minimum qui sera utilisé pour obtenir des résultats exploitables.

Ce projet est basé sur des résultats initiaux tant sur l'interaction de la protéine bêta-amyloïde avec les récepteurs nicotiniques (données publiées) que sur la technique de réimplantation qui a donné lieu à l'obtention de données exploitables dans le cadre d'un projet antérieur. La mise au point préalable de l'obtention de précurseurs neuronaux humains ainsi que leurs caractérisations ayant déjà été réalisées in vitro et publiées permettront également de réduire à son minimum le nombre d'animaux utilisés pour ce projet.

12509 Ce projet a pour objectif d'améliorer notre compréhension des mécanismes qui conduisent à des allergies sévères et notamment des chocs anaphylactiques. Nous cherchons à définir les changements du système immunitaire dans le processus de sensibilisation, dans la phase aiguë de la réaction mais également dans le processus de désensibilisation en réponse à différents

allergènes. Nous nous intéressons au rôle des cellules effectrices ainsi qu'aux anticorps et leurs récepteurs dans ces processus.

Nous cherchons à mieux comprendre des changements du système immunitaire pendant et en aval des réactions allergiques. Pour cela nous souhaitons identifier et caractériser les mécanismes cellulaires et non-cellulaires impliqués dans les réactions allergiques systémiques et identifier des cibles thérapeutiques potentielles.

8584 souris de laboratoire (mâles et femelles, à l'âge de jeune adulte) seront utilisées sur une période de 5 ans. La taille des lots a été réduite à leur strict minimum, tout en gardant des nombres assez importants afin de pouvoir observer des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Ce projet comporte trois procédures de classe légère (procédure 1) ou modérée (procédures 2 et 3) :

Dans la première procédure, dite « passive », les animaux seront sensibilisés par le transfert d'anticorps ; La réaction allergique sera ensuite déclenchée par un challenge avec l'antigène spécifique. La réaction allergique n'induit pas de douleur et se caractérise par une chute de température et de l'activité de l'animal associée à une vasodilatation et une chute de la tension. Pour information, aucun antidouleur n'est donné en pratique clinique à des patients en cours ou suite à une anaphylaxie.

La deuxième procédure, dite « active », nécessite une phase d'immunisation pendant laquelle l'animal sera exposé plusieurs fois à un antigène généralement en présence d'un adjuvant. En dehors de l'injection, le processus d'immunisation (6-12 semaines) est indolore. Comme dans la procédure précédente la réaction allergique est ensuite déclenchée par induction (« challenge ») avec l'antigène ayant servi à immuniser l'animal. Dans le cas de la procédure « active » les symptômes observés sont parfois plus sévères que dans la procédure passive. Ils peuvent parfois conduire à la mort de l'animal. Nous avons fixé des points limites (perte de température $>7^{\circ}\text{C}$, convulsions), afin d'intervenir avant la mort expérimentale.

Dans la troisième procédure, dite « désensibilisée », une phase de désensibilisation est ajoutée aux gestes décrits dans la deuxième procédure. Elle a pour but de restaurer un état de tolérance à l'antigène chez l'animal. Chez des animaux sensibilisés l'antigène sera réintroduit par voie sous-cutanée avec des doses très faibles d'antigène pour les premières réintroductions. Ces doses seront ensuite augmentées pour les réintroductions suivantes chez le même animal afin d'induire une tolérance systémique à des doses biologiquement significatives d'antigène, comme cela est réalisé en pratique clinique chez l'homme.

Pour que notre approche correspond à un modèle préclinique pertinent et avec le minimum d'inconfort/souffrance pour les souris de laboratoire, nous nous sommes imposés deux contraintes: i) établissement de modèles permettant de déterminer les phénotypes le plus précocement possible et ii) mise en œuvre d'analyses in vivo avec des fenêtres temporelles les plus courtes possibles.

Les pathologies et thérapies qui vont être étudiées ici résultent de réactions systémiques et impliquent des conséquences au niveau de différents tissus et organes. Ces processus sont complexes, reposant sur les singularités du système circulatoire et des tissus cibles, processus qui ne peuvent pas être reproduits in vitro. Nos procédures expérimentales ne peuvent donc pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information biologiquement pertinent.

Le nombre de souris par groupe a été déterminé à l'aide d'outils statistiques pour limiter ce nombre au minimum nécessaire pour obtenir des résultats significatifs. Le recours à des lignées de souris consanguines de souris permet, entre autres, de réduire le nombre d'animaux par groupe expérimental, et de ne pas prolonger les explorations dès lors que sont initiées et mesurables les conséquences biologiques des réactions anaphylactiques. Les animaux seront observés régulièrement et des points limites sont définis pour intervenir au plus tôt pour réduire douleur, inconfort et stress (administration d'analgésique ou euthanasie).

12510 L'amélioration du bien-être animal a été jusqu'à présent freinée par la difficulté de mesurer objectivement l'état émotionnel des animaux, en particulier sur de longues durées (semaines/mois/années). La principale approche utilisée jusqu'à présent, est la tâche de biais de jugement, inspirée de la psychologie cognitive. Cette approche a été appliquée avec succès dans diverses espèces y compris les ovins, mais son utilisation est compliquée du fait de l'investissement en temps nécessaire à l'entraînement de chaque individu (plusieurs jours ou semaines).

Récemment validé une nouvelle approche, inspirée de la neurobiologie du stress, pour mesurer les états émotionnels des animaux en utilisant la neuroimagerie a été développée. En effet, de nombreuses études chez l'homme, les rongeurs et les primates non-humains ont montré que la quantité de matière grise dans une partie spécifique de l'hippocampe est un bon marqueur de l'état émotionnel de longue durée d'un individu et co-varie avec l'exposition répétée de l'individu à des événements stressants ou à des événements perçus positivement. Cette mesure de matière grise peut être réalisée de façon non-invasive chez l'individu en utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Dans ce projet, nous proposons d'utiliser les outils d'IRM développés chez le mouton afin de tester l'hypothèse que cette nouvelle approche peut être utilisée pour mesurer l'état émotionnel de longue durée chez cette espèce.

Ainsi, nous mettrons des brebis en situation de stress chronique (par une exposition répétée à des événements stressants et imprédictibles, n=12) ou en hébergement normal (n=12) et après une période de 6 semaines de stress, nous mettrons en relation les changements comportementaux et endocriniens (cortisol) observés avec les modifications volumétriques de l'hippocampe mesurées par IRM.

Ce protocole respecte la règle des 3R :

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

Raffinement: Les animaux seront hébergés en groupes sur paille. L'IRM est une méthode non invasive permettant un suivi longitudinal des mécanismes neurobiologiques.

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés (2 groupes de 12 femelles) a été limité au minimum tout en permettant une analyse statistique fiable.

12511 La malnutrition chronique chez l'enfant est un problème majeur de santé publique dans les pays en développement, touchant aujourd'hui plus de 150 millions d'enfants dans le monde. Les conséquences à long terme sont particulièrement délétères, notamment marquées par un retard de croissance ainsi que des déficits neurocognitifs qui persistent à l'âge adulte. De nombreuses études suggèrent que les macronutriments critiques dans cette période de la vie sont les protéines. Une alimentation appauvrie en protéines induit notamment un retard de croissance chez le rongeur. Des études récentes suggèrent un lien fort entre composition du microbiote intestinal et régime nutritionnel. En particulier, une intervention probiotique chez le rongeur dans un contexte de malnutrition permet de compenser partiellement le retard de croissance chez le juvénile.

L'objectif de cette étude est d'étudier l'effet d'un probiotique (c'est-à-dire un micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante, exerce des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels) sur le développement des systèmes nerveux central et périphérique dans un contexte de malnutrition protéique. Les mères gestantes seront nourries à la pipette avec une solution placebo ou probiotique, ce qui constitue une douleur inférieure à celle causée par l'introduction d'une aiguille. Il s'agira ensuite de nourrir des souris après le sevrage avec un régime appauvri en protéines afin de comprendre l'effet de la malnutrition sur le développement des systèmes nerveux. Ce régime appauvri en protéines a déjà été testé et n'induit pas de comportement agressif chez les juvéniles. Nous faisons l'hypothèse qu'une intervention probiotique chez les individus juvéniles permettra de restaurer partiellement les déficits observés dans le

contexte de malnutrition. Cette étude permettra donc l'établissement d'un modèle préclinique ouvrant la porte à de possibles visées thérapeutiques chez l'Homme.

Le projet a été conçu pour respecter la règle des 3R: raffiner, réduire, remplacer. En effet, le nombre d'animaux et de groupes a été réduit au maximum sans toutefois mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Cette étude implique une réponse intégrée au niveau de l'organisme (interactions nutrition/microbiote), ce qui justifie une étude chez l'animal. Les procédures répondront aussi à ces exigences avec, en plus, la mise en place de points limites bien définis et suffisamment précoces et prédictifs pour prévenir tout stress et toute douleur de l'animal. Les conditions d'hébergement, les soins et les procédures seront réalisées par du personnel qualifié. Il s'agit d'une étude sur 150 souris portant sur 5 ans, en raison de la durée des régimes et du nombre de procédures expérimentales effectuées.

12512 Les protéines sont des molécules biologiques présentes dans toutes les cellules vivantes. Lors de leur synthèse, elles peuvent nécessiter des modifications pour devenir actives biologiquement. Ces modifications peuvent être mise en œuvre par des protéines appelées protéines convertases (PCs). Des résultats, antérieurs et récents, ont permis de définir une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur l'inhibition de l'activation de protéines impliquées dans le développement du cancer et des métastases. Ces travaux ont mis en évidence le rôle important des modifications par les PCs dans l'acquisition des caractéristiques cancéreuses des cellules. La conception ou l'identification d'inhibiteurs chimiques des convertases puissants et spécifiques en tant que molécule respectivement anti-angiogéniques (empêchant le recrutement des vaisseaux sanguins nécessaires à la tumeur) et/ou anti-tumorigéniques (empêchant la croissance tumorale) pourraient permettre de développer de nouvelles thérapies ciblées seules ou en combinaison avec les agents déjà existants pour le traitement de certains cancers.

Nous avons récemment identifié des petites molécules inhibitrices des PCs. Dans ce projet de recherche nous évaluerons leur efficacité sur la progression tumorale, l'apparition de métastases et l'angiogenèse (recrutement de nouveaux vaisseaux sanguins) à l'intérieur des tumeurs. Cette étude a pour but d'évaluer in vivo les effets anti-tumoraux et anti-métastatiques de deux inhibiteurs synthétiques identifiés par notre groupe. Le modèle de la souris est le plus adapté à notre projet de recherche car nous avons différents modèles de tumeurs à greffer chez la souris qui se comportent comme des tumeurs humaines. De plus les PCs sont très homologues chez la souris et chez l'homme. Et enfin, nous avons un modèle de souris pouvant développer des tumeurs colorectales spontanées après l'injection d'un produit chimique. Tout en veillant à limiter le nombre d'animaux impliqués dans ce projet de recherche, ces modèles nous permettront de confirmer et d'évaluer les effets réels des PCs et de nos molécules inhibitrices sur la croissance tumorale, la formation de métastases et l'angiogenèse.

Ce projet de développement d'inhibiteur des PCs en tant que nouvelle stratégie dans le traitement du cancer nécessite 4788 animaux.

Dans ce contexte, nous veillerons à respecter la règle des 3R:

-Remplacer: des tests sur des cellules tumorales et des cellules normales en culture in vitro nous ont déjà permis de déterminer certains effets de nos molécules. Cependant, l'utilisation de modèles in vivo comme la souris est indispensable à la compréhension des mécanismes d'action de ces molécules dans un organisme entier proche de l'homme, incluant des paramètres comme le développement tumoral, le microenvironnement, les contraintes physiques etc. qui ne sont pas retrouvés in vitro. Cette étape est également nécessaire puisque nous envisageons une potentielle et future utilisation chez l'homme comme thérapie.

-Réduire: afin de limiter au maximum le nombre d'animaux, nous utiliserons les mêmes souris pour nos contrôles positifs et négatifs dès que ce sera possible. Cette association nous permet de réduire le nombre de souris contrôles utilisées. Le nombre d'animaux par lot sera également réduit au maximum afin d'avoir des résultats statistiquement significatifs (lots de 6 animaux par condition).

-Raffiner: le bien-être de l'animal au quotidien est nécessaire au bon déroulement de nos expériences, mais également à la reproductibilité de nos résultats. Des enrichissements (maisons

rouges) sont présents dans les cages. Au cours de nos expériences, de la nourriture humidifiée sera accessible directement dans la cage pour éviter la déshydratation des souris après la chirurgie. Des tapis chauffants seront également utilisés dès l'anesthésie des souris, pendant l'opération, et lors de la phase de réveil. Des injections d'analgésique pré et postopératoire pourront être réalisées en fonction de l'expérience et de la souffrance de l'animal. Un suivi attentif par du personnel compétent et formé, weekend compris, sera également mis en place. Au moindre doute, nous ferons appel aux conseils de notre vétérinaire ou de la structure du Bien-Etre Animal (SBEA).

12513 La Maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par des pertes de mémoire et de fonctions physiologiques associées à l'accumulation de protéines dans le cerveau. Les peptides β amyloïdes ($A\beta$) modifient le fonctionnement des neurones, s'accumulent à l'extérieur des neurones et forment des plaques, ils modifient également l'état d'autres protéines: les protéines tau qui s'accumulent à l'intérieur des neurones et les tuent. Cependant, chez certains patients la présence importante de plaques ne provoque pas de déficit cognitif. Pour expliquer cette résistance à la maladie, il a été proposé que les réseaux neuronaux fortement sollicités qui produisent beaucoup de peptides $A\beta$, puissent être remplacés par des circuits neuronaux alternatifs pouvant retarder le déclin cognitif. La structure et la physiologie de ces nouveaux réseaux restent inconnues, étudier leur mise en place et leur résistance à la MA offre de nouvelles perspectives de traitement.

Pour valider la mise en place de réseaux alternatifs au cours du développement de la MA ou du vieillissement cognitif et comprendre le rôle des peptides $A\beta$ dans cette réorganisation, nous proposons une étude électrophysiologique in vivo sur des souris transgéniques modèles de la MA et des souris âgées. Au cours de cette étude, nous allons tester les effets d'une molécule qui est capable de réduire les peptides $A\beta$ et d'améliorer les déficits cognitifs sur le fonctionnement des réseaux neuronaux.

Au total, nous avons besoin de 600 souris. Les expériences seront menées sur mâles et femelles en parallèle afin de comparer les effets sur les 2 sexes et afin de Réduire les productions d'animaux. Nous ne pouvons pas Remplacer tout ou une partie de ces études par des tests in vitro ou sur cellule car nos expériences requièrent les capacités mnésiques de l'animal et l'intégrité des réseaux hippocampo-corticaux. Nos expériences ont été conçues et Raffinées en optimisant les informations obtenues sur chaque souris et en veillant au bien-être animal à chaque étape. Des points limites et critères d'interruption sont observés tout au long de nos procédures afin de veiller au bien-être des animaux et à l'interprétation de nos résultats.

12514 La validation de nouveaux marqueurs de la maladie d'Alzheimer (MA) est cruciale pour permettre un diagnostic précoce de la maladie et le développement des nouveaux traitements. Certaines études rapportent une augmentation de la concentration en fer cérébrale au cours de la maladie. Cette augmentation de la charge en fer pourrait être mesurée en IRM à l'aide d'un paramètre appelé susceptibilité magnétique cérébrale. Néanmoins, la cinétique de ces modifications IRM et leur lien avec les deux marqueurs principaux de la MA, dépôts amyloïdes et dégénérescence neurofibrillaire, restent inconnus.

Cette étude se propose de mesurer de manière longitudinale en IRM les modifications de la charge en fer cérébrale au sein de 2 modèles animaux transgéniques de MA et d'évaluer leur lien chronologique et spatial avec les dépôts amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire.

Deux lignées de souris transgéniques seront étudiées dans ce projet : un modèle permettant d'étudier le lien avec les dépôts amyloïdes (APP/PS1), un modèle permettant d'étudier le lien avec la dégénérescence neurofibrillaire (THY-tau30). Pour chaque modèle, 36 souris transgéniques (18 mâles/18 femelles) et 36 souris sauvages (18 mâles/18 femelles) seront évaluées en IRM et sur le plan comportemental à 3 points temporels (3 mois, avant la survenue des anomalies histopathologiques ; 6mois, au moment de l'apparition des anomalies histopathologiques ; 9 mois, au moment où les anomalies histopathologiques sont bien installées), soit un nombre maximal d'animaux estimé à 144. Les tests comportementaux évalueront notamment la mémoire de référence spatiale, la mémoire de travail et l'anxiété. Nous compléterons par une étude histo-

pathologique post-mortem des marqueurs de la MA : dépôts amyloïdes ou de la dégénérescence neurofibrillaire.

Pour limiter l'utilisation d'animaux, le protocole d'IRM a été optimisé au préalable (Réduction). De la même façon, les animaux étudiés en IRM seront aussi utilisés pour l'évaluation comportementale et l'étude histologique post-mortem (Réduction). Par ailleurs, un suivi quotidien des animaux sera effectué pour détecter l'apparition éventuelle de souffrance ou de points limites pour lesquels des décisions adaptées de traitement analgésiques voir d'euthanasie seront prises (Raffinement). Par ailleurs, les animaux sont stabulés dans une zone contrôlée en température et humidité et cycles jour/ nuit, au maximum à 5 par cage, avec enrichissement de milieu. Vu les objectifs de l'étude, le remplacement du modèle par des méthodes substitutives n'est pas réalisable (Remplacement).

La susceptibilité magnétique cérébrale devrait être précocement augmentée en raison de l'accumulation de fer au moment de l'apparition de dépôts amyloïdes et/ou de la dégénérescence neurofibrillaire. Ce nouveau marqueur IRM non invasif pourrait permettre un diagnostic précoce de la MA et pourrait être utilisé pour évaluer l'action de nouveaux traitements potentiels ciblant les perturbations du métabolisme cérébral du fer.

12515 La vaccination fait partie des avancées majeures dans le domaine de la santé publique. Elle permet de protéger la population chaque année contre la grippe ou les maladies infantiles. La vaccination permet une protection à long terme grâce à la production d'anticorps ou de lymphocytes T effecteurs mais également grâce à l'induction d'une mémoire immunitaire (augmentation du pool de cellules capables de reconnaître l'antigène d'intérêt). De manière générale, un vaccin doit pouvoir cibler une population en répondant à différents critères: 1/ assurer un effet protecteur à long terme contre le pathogène, 2/ ne pas induire d'effets secondaires majeurs et 3/ être facile à mettre en œuvre et de faible coût. Depuis les débuts de la vaccination, différents types de vaccins ont été mis au point, basés sur des virus inactifs, des vaccins sous-unitaires voire des vecteurs (non viraux, viraux ou bactériens) codant pour un antigène cible. Il est possible également d'utiliser des particules virales ayant intégré à leur surface tout ou partie d'un antigène cible. Parmi les virus, les bactériophages (virus bactériens) ont été utilisés dans des approches biotechnologiques comme le phage display qui repose sur l'insertion d'ADN exogène au niveau d'une des protéines de capsides du phage. Ces bactériophages (notamment lambda, T4 et T7) ont également été utilisés dans quelques études de vaccination notamment du fait de la facilité à les produire à grande échelle et du fait qu'ils ne se répliquent pas dans les cellules de mammifères.

Notre projet a pour objectif d'analyser si le bactériophage T5 peut être utilisé comme plateforme vaccinale. Dans le cadre d'une collaboration, nous voulons évaluer la capacité de capsides de bactériophages T5 recouvertes d'un antigène modèle (ovalbumine) à générer des réponses immunitaires chez la souris contre cet antigène. Pour analyser la capacité de capsides recouvertes d'antigènes à induire des réponses immunitaires, l'utilisation de modèles murins est nécessaire. En effet, il reste impossible à ce jour de reproduire par des techniques in vitro les interactions des différentes cellules et molécules du système immunitaire nécessaires à l'établissement et à la maturation des réponses immunitaires.

Le projet mettra en œuvre une seule procédure expérimentale. Dans cette procédure, différentes préparations vaccinales seront injectées chez la souris par différentes voies d'administration et nous quantifierons les réponses immunitaires. En particulier, nous évaluerons l'influence de différents paramètres sur l'efficacité vaccinale (dose d'antigène, mode d'administration, état immun ou non vis-à-vis de la capside du phage). Dans toutes les expériences, nous chercherons à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, les analyses des réponses humorales et cellulaires se feront sur les mêmes groupes expérimentaux. Compte-tenu de la littérature et de notre expérience avec d'autres plateformes vaccinales (vecteurs adénoviraux), nous estimons que nous pourrions réduire le nombre d'animaux à 10 par groupe expérimental. Le nombre d'animaux par groupe expérimental nous permettra d'évaluer la significativité des résultats obtenus (test ANOVA suivi d'un test de Tukey). La procédure expérimentale sera faite sous anesthésie (locale ou générale dépendamment des actes). Le suivi régulier des animaux permettra d'identifier la survenue éventuelle d'érythèmes et ulcérations au point d'administration des préparations vaccinales et les

éventuels comportements de douleurs associés. Dans ce cas, des traitements locaux seront mis en œuvre et ces observations nous conduiront à diminuer les doses d'antigènes administrés dans les expériences suivantes.

Au total, nous estimons que le nombre de souris requises pour mener à bien ce projet au cours des prochaines années et générer des résultats significatifs sur un plan statistique sera, compte-tenu des différentes préparations vaccinales et des paramètres étudiés, d'un maximum de 320 souris. Ce projet permettra d'explorer la capacité d'une nouvelle plateforme vaccinale dérivée du bactériophage T5 à induire des réponses immunitaires contre un antigène modèle. Si l'efficacité de cette plateforme vaccinale est démontrée, nous pourrions alors envisager dans le futur d'utiliser cette plateforme vaccinale contre des cibles d'intérêt thérapeutique.

12516 Dans le cerveau, les astrocytes sont des cellules à morphologie complexe. Leurs ramifications vont au contact des vaisseaux sanguins cérébraux et des synapses où ils contrôlent les fonctions vasculaires et synaptiques. Au laboratoire, nous cherchons à comprendre comment ces cellules exercent ces fonctions de régulation. En effet, en plus de son intérêt fondamental, cette question revêt un intérêt médical car de nombreuses pathologies du cerveau telles que l'épilepsie ou la sclérose en plaques sont liées au mauvais fonctionnement des astrocytes à l'interface vasculaire et neuronale.

Nous avons récemment montré au laboratoire qu'un des mécanismes moléculaires contrôlant les fonctions astrocytaires à distance de leur corps cellulaire est la synthèse protéique locale. Ces données suggèrent que les ramifications astrocytaires sont équipés des organelles qui permettent la synthèse et la maturation des protéines tels que le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Cependant en raison de la très petite taille de ces compartiments cellulaires, aucune technique d'imagerie classique ne permet de les repérer et de les étudier directement.

Pour caractériser ces organelles, nous avons donc développé des virus exprimant des gènes rapporteurs fluorescents permettant de les visualiser spécifiquement dans les astrocytes. Ces outils ont déjà été utilisés pour des études précédentes sur les neurones et ont été validés par plusieurs publications. Leur injection par stéréotaxie dans le cerveau de souris permettra de faire exprimer ces gènes fluorescents dans les astrocytes de la zone cérébrale injectée et de pouvoir les visualiser sur des coupes histologiques de cerveau. Nous aurons ainsi pour la première fois la possibilité d'étudier l'organisation cellulaire des prolongements astrocytaires qui vont au contact des vaisseaux et des synapses. Ces expériences seront menées sur des souris sauvages C57Bl6 adultes ainsi délétées pour MLC1 (modèle non dommageable) qui est un modèle d'étude de l'interface astrocyte/vaisseaux sanguins du cerveau. MLC1 est une protéine des pieds astrocytaires qui recouvre les vaisseaux sanguins cérébraux. Nos observations montrent qu'en l'absence de cette protéine, les pieds astrocytaires ont une polarité modifiée et cette polarité pourrait impliquer un déplacement ou une réorganisation de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique astrocytaire périvasculaire.

Ce projet ne peut être réalisé in vitro car les astrocytes primaires ou les lignées cellulaires astrocytaires ne développent pas d'interfaces spécifiques avec les autres types cellulaires du cerveau. C'est la raison pour laquelle cette étude ne peut être menée que sur un modèle animal. La souris est le modèle choisi car il s'agit d'un très bon modèle pour étudier le cerveau des mammifères et qu'il permet le développement de modèles génétiquement modifiés tel que le modèle MLC1.

Ce projet s'étalera sur 3 ans et utilisera 120 souris C57BL6 et 120 souris MLC1 adultes (Total 240 souris). Ce nombre a été rationalisé à partir de l'expérience du laboratoire en stéréotaxie. L'ensemble des expériences sera effectué par des personnes habilitées. Nous nous engageons à réduire au maximum les techniques douloureuses ou stressantes par l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques et en veillant au bien-être des animaux, en particulier après les procédures chirurgicales, afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation.

Ce projet permettra de caractériser l'organisation subcellulaire des astrocytes à l'interface vasculaire et synaptique.

12517 Les maladies neurodéveloppementales de type autisme ou retard mental représentent un enjeu de société considérable. En effet ces maladies, liées au développement anormal du système nerveux, se caractérisent par des troubles du comportement, de l'humeur, des relations sociales, et des déficits cognitifs extrêmement invalidants. Il a longtemps été considéré que l'autisme était la conséquence de problèmes dans la relation entre la mère et son enfant. Aujourd'hui, suite aux progrès des connaissances épidémiologiques, génétiques et médicales, on privilégie l'hypothèse physiologique des troubles du syndrome autistique (TSA). Ainsi, certaines mutations comme par exemple dans le gène *Fmr1* sont associées à des TSA dans plus de 30% des cas chez l'homme. Certaines molécules chimiques ont également été mises en cause. Le valproate, une drogue prescrite comme anti-épileptique, et le Chloropyriphos, un insecticide, sont tous deux responsables de troubles autistiques et/ou de retard mental chez les individus exposés pendant la grossesse. Mais on connaît encore très mal les mécanismes impliqués dans ces pathologies complexes car le développement du système nerveux implique de très nombreux facteurs en interaction. L'étude de modèles animaux (transgéniques ou exposés à des agents chimiques perturbateurs des systèmes neuronaux immatures) est essentielle pour identifier les mécanismes en cause, les raisons de cette toxicité et les agents auxquels il convient d'empêcher l'exposition du fœtus. Le rat dispose d'un répertoire comportemental plus élaboré et mieux adapté aux évaluations cognitives, et la physiologie de son développement est mieux caractérisée, mais la souris est plus facile à manipuler génétiquement et est donc l'espèce de choix pour les modèles génétiques. Afin d'identifier les mécanismes communs ou au contraire spécifiques aux multiples formes de troubles neurodéveloppementaux selon leur origine génétique ou environnementale, il est nécessaire de mener en parallèle des études sur plusieurs modèles. C'est pourquoi nous prévoyons dans ce projet d'étudier 3 modèles génétiques et 2 modèles pharmacologiques de troubles neurodéveloppementaux, chez le rat et la souris.

Nous allons tester l'hypothèse d'un développement anormal des interactions neuronales au sein des circuits clés de la cognition, ex vivo et in vivo. Les procédures consistent à préparer les animaux (souris transgéniques ou animaux ayant subi une exposition prénatale à des perturbateurs chimiques) aux conditions expérimentales spécifiques (par exemple implantation d'électrodes pour enregistrement in vivo ou prélèvement du cerveau pour enregistrement ex vivo), à examiner expérimentalement la réponse fonctionnelle des circuits neuronaux et à certains tests thérapeutiques, après quoi le cerveau est prélevé pour caractérisation histologique.

Du fait de l'organisation de notre institut avec deux zones distinctes d'expérimentation animale (dénommées R1 et R2) au sein du même bâtiment mais ayant chacune leur numéro d'agrément, les procédures sont réparties et décrites dans deux saisines distinctes. Certains animaux doivent passer d'une zone à l'autre au fil des procédures. Le transfert se fait dans des cages d'élevage standards munies d'un couvercle filtrant, et prend à peine quelques minutes.

Les avantages escomptés sont une meilleure compréhension du fonctionnement cérébral et de ses pathologies (notamment neurodéveloppementales du type autisme ou retard mental). Les dommages escomptés sont l'euthanasie prématurée de rats et de souris, et parfois le maintien en cage individuelle pendant la période expérimentale, entraînant un déficit de relations sociales chez ces espèces grégaires. Le projet implique également des interventions chirurgicales (craniotomie) afin d'insérer des électrodes pour enregistrer l'activité cérébrale sur l'animal en comportement, avec l'inconfort associé au réveil post-chirurgical.

Ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement.

L'étude des propriétés des circuits neuronaux impliqués dans la cognition nécessite l'observation et la manipulation de systèmes neuronaux intacts, et ne peut donc se faire que sur l'animal vivant. Il est en effet à ce stade de nos connaissances impossible de modéliser de façon réaliste le fonctionnement cognitif in vitro ou in silico. Nous avons opté pour l'utilisation du rat et de la souris car ils présentent le meilleur équilibre entre les bénéfices (accessibilité expérimentale et pertinence

par rapport aux pathologies chez l'homme) et les dommages escomptés (souffrance liées aux conditions d'expérimentation).

Le nombre d'animaux nécessaires pour garantir un pouvoir statistique suffisant pour chacune de nos expériences (seuil de significativité basé sur la variance typique de ce type de données expérimentales) est ici de 320 rats et 1560 souris, répartis sur une période de projet de 5 années.

Les animaux utilisés sont des rats et des souris, dont certaines de lignées transgéniques, modèles de maladies neurodéveloppementales. Ces modèles ont pour but de reproduire les altérations développementales des circuits neuronaux qui sous-tendent la pathologie chez l'homme. Toutefois, aucune étude à notre connaissance ne montre que les troubles associés au développement des circuits neuronaux dans les modèles que nous utilisons soient douloureux pour l'animal, et le phénotype, qui est bien moins marqué que dans la pathologie humaine (pas d'isolement social ou d'auto-mutilations sur nos modèles animaux par exemple), n'est pas considéré comme dommageable. Des éléments de distraction (les animaux sont élevés en cages collectives, autant que possible, selon des normes qui respectent leur besoin d'interactions sociales, et le milieu est enrichi avec du matériel de construction du nid) sont introduits dans les cages d'élevage. Les chirurgies sont réalisées selon le respect des règles d'asepsie, et la douleur prise en charge par traitement pharmacologique. Des points limites sont fixés pour minimiser la souffrance. Pour prévenir, détecter et corriger les conditions de mal-être éventuel, les animaux sont suivis de façon très régulière par du personnel spécialisé, formé et sensibilisé au bien-être animal.

12518 Le système nerveux central, dont fait partie le cerveau, est composé de plusieurs types cellulaires : les neurones, mais également les cellules gliales dont les astrocytes. Ces derniers sont reconnus comme des acteurs essentiels à la physiologie et impactés dans de nombreuses pathologies. Ils interagissent notamment avec les vaisseaux sanguins où ils participent à la régulation des fonctions vasculaires, comme l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. Ils forment ainsi avec les vaisseaux l'unité gliovasculaire, qui est perturbée dans l'ensemble des maladies touchant le cerveau.

Parmi les défis actuels en santé publique, les maladies liées au développement du cerveau, comme les troubles autistiques ou psychiatriques, ont une place importante. Cependant les étiologies de ces maladies sont encore largement méconnues. En particulier, un possible rôle des astrocytes reste à démontrer.

Dans ce projet, nous étudions la mise en place de l'unité gliovasculaire au cours du développement du cortex cérébral et cherchons à identifier de nouveaux acteurs moléculaires de mise en place de l'unité gliovasculaire.

Ce projet nécessitera un total de 1236 souris. Il respecte les principes énoncés par les 3R (remplacement, réduction, raffinement). L'expérimentation animale sur un système murin est essentielle, car nous ne pouvons le remplacer par un système *in vitro* où il est impossible de recréer les multiples interactions cellulaires d'un système complexe en développement. Il n'existe pas non plus d'autres modèles à l'heure actuelle permettant de répondre à nos questions biologiques. Cependant, le nombre d'animaux utilisés sera réduit autant que possible et correspond au minimum nécessaire pour obtenir des résultats scientifiques significatifs. Les élevages sont effectués en groupe avec enrichissement de l'environnement et toutes les précautions sont assurées afin de respecter au mieux le bien-être animal. Les femelles subissant une opération feront l'objet d'une surveillance accrue pendant la procédure de chirurgie et les jours suivants (points limites).

Ce projet devrait permettre d'apporter un éclairage nouveau sur le rôle des astrocytes dans le développement cérébral, dont les défauts sont une cause importante de handicap cognitif et moteur.

12519 1-objectif scientifique du projet

Une cellule souche est une cellule indifférenciée capable à la fois de générer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire et de se maintenir dans l'organisme par prolifération. Ces cellules souches ont différentes fonctions dans les organismes. Dans les premières phases du développement embryonnaire, elles se multiplient pour générer peu à peu toutes les cellules du

corps, qu'elles soient différenciées ou non. Dans les tissus adultes, les cellules souches sont beaucoup plus rares et regroupées dans des régions particulières des organes. Elles contribuent au renouvellement naturel des tissus ou à leur réparation en cas de lésion. Cependant, tous les organes n'en sont pas pourvus, comme le cœur ou le pancréas.

Des travaux préliminaires ont mis en évidence l'existence de cellules souches dans le tissu (=le stroma) du pancréas de souris atteintes de cancer pancréatique. Ces cellules ont été isolées et mise à proliférer en culture pour établir des lignées permettant leur étude ex vivo et in vitro et ainsi réduire les besoins en expérimentation animale. Ces cellules souches stromales de souris ont été caractérisées et il a été montré qu'elles interagissaient avec les cellules du système immunitaire (lymphocytes T CD8+ et macrophages) et reculaient leur activité.

L'objectif maintenant est d'étudier in vivo les mécanismes d'échappement de ces cellules souches au contrôle immunitaire et de démontrer l'impact de ce phénomène sur la progression tumorale pancréatique. Afin de répondre à ces questions il est nécessaire d'utiliser un organisme vivant pourvu d'un système immunitaire. Pour cela deux types souris ayant un système immunitaire différent seront utilisés: des souris immunocompétentes et des souris immunodéprimées.

2-retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

On estime à environ 10.000 le nombre de nouveaux cas de cancer du pancréas en France. L'incidence dans le monde, varie entre 1 et 10 cas pour 100 000 personnes et reste globalement stable dans le temps mais en croissance dans les pays développés. Le cancer du pancréas est difficile à diagnostiquer et particulièrement compliqué à traiter. Il résiste en effet à plusieurs traitements anti-tumoraux.

L'observation ex vivo et in vitro de cellules souches stromales dans le pancréas de souris atteinte de cancer poussent à s'interroger sur la présence et l'impact de ces cellules. Pour comprendre le rôle de ces cellules leur mécanisme in vivo doit être exploré sur des modèles murins. La démonstration de l'implication de ces cellules in vivo dans un modèle préclinique permettrait une meilleure compréhension des mécanismes de progression tumorale et la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques afin de restaurer une réponse immunitaire efficace

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

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée.

Réduction :

Le nombre de souris sera réduit à minima pour permettre une analyse statistique et l'obtention de conclusions interprétables qui conduiront à ne pas répéter inutilement les expériences que nous mettons en place sur les animaux

Raffinement :

Afin de maximiser l'obtention des données scientifiques et raffiner nos approches expérimentales, nous établirons un suivi attentif des souris et fixeront des points limites pour réduire au maximum la souffrance des animaux et éviter l'apparition de tout signe de souffrance inutile et non bénéfique à l'obtention de données scientifiques de qualité.

Remplacement :

Des outils cellulaires (=4 lignées de cellules épithéliales ductales et 1 lignée stromale) ont préalablement été générés pour caractériser et valider ces cellules ex vivo et in vitro alternativement à leur étude in vivo. L'évaluation préclinique in vivo de l'impact des cellules souches stromales sur les différentes lignées épithéliales est maintenant indispensable pour la compréhension de leur mécanisme d'action. Les cellules épithéliales seront soit injectées seules soit coinjectées avec des cellules stromales en sous-cutané chez la souris. La croissance tumorale sera suivie pendant 15 jours.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Au total 380 souris

12520 La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente, touchant plus de 160 000 personnes en France. Elle est causée par la dégénérescence des neurones fabriquant la dopamine. Le principal traitement consiste à remplacer la dopamine manquante par son précurseur, la L-DOPA. Cependant, après une période de "lune de miel" où le traitement agit efficacement, ce traitement devient moins efficace et des effets secondaires très invalidants apparaissent. A ce stade de la maladie, le seul traitement proposé est la stimulation cérébrale profonde du noyau subthalamique (appelée STN-DBS pour SubThalamic Nucleus Deep Brain Stimulation). Très efficace, ce traitement requiert cependant une intervention chirurgicale lourde, ce qui limite le nombre de patients pouvant en bénéficier. Les mécanismes d'action de la STN-DBS sont encore mal connus. Notre projet vise à mieux comprendre ces mécanismes, de manière à proposer des alternatives thérapeutiques moins invasives, donc pouvant bénéficier à plus de patients. Nous nous intéressons en particulier aux mécanismes d'action de la STN-DBS sur le cortex pour plusieurs raisons : d'une part, des résultats préliminaires suggèrent que cette stimulation agit sur le cortex ; d'autre part, le cortex étant, une structure superficielle du cerveau, il serait plus facile à atteindre comme cible thérapeutique que le noyau subthalamique.

Nous explorerons donc les effets de la STN-DBS sur l'activité du cortex moteur. Notre hypothèse, basée sur des études chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, est que les symptômes moteurs sont dûs à une hyperactivité pathologique du cortex moteur, et que la STN-DBS permet de réduire cette hyperactivité pathologique (et donc les symptômes), en activant certaines populations de neurones corticaux, en particulier les neurones inhibiteurs (dont il existe plusieurs sous-types). Dans un premier temps, nous vérifierons que l'hyperactivité corticale observée chez les patients est également présente dans le modèle souris de la maladie de Parkinson. Nous étudierons ensuite l'effet de la STN-DBS chez le rat ou la souris anesthésiée, en condition normale et Parkinson, en nous attachant à identifier les sous-types de neurones inhibiteurs activés par la STN-DBS grâce à des lignées de souris transgéniques. Enfin, nous utiliserons ces lignées transgéniques pour activer directement les sous-types de neurones inhibiteurs chez des souris parkinsoniennes éveillées, pour tester si cette activation directe permet d'améliorer les symptômes moteurs en l'absence de STN-DBS. Les modifications génétiques dans ces lignées transgéniques ne perturbent pas la physiologie des animaux, et sont complètement "silencieuses" (phénotype "non-dommageable"). Nos résultats permettront de définir une cible thérapeutique potentielle, les neurones inhibiteurs du cortex, qui mimera les effets de la STN-DBS, dans le but d'établir une procédure moins invasive qui pourra permettre à des patients potentiellement non éligibles à la stimulation cérébrale profonde de bénéficier d'une nouvelle approche thérapeutique innovante.

Remplacement : il n'existe pas de modèle mathématique ni in vitro décrivant l'activité cérébrale dans sa complexité pour pouvoir tester les effets de la STN-DBS sur le cortex, et encore moins pour tester des effets thérapeutiques de l'activation des neurones inhibiteurs dans un modèle de la maladie de Parkinson, d'où la nécessité d'avoir recours à des animaux vivants. Il est nécessaire d'utiliser un modèle animal mammifère pour obtenir des résultats potentiellement transposables à l'Homme, car les structures étudiées ne sont pas présentes, ou sont organisées différemment chez les autres vertébrés (et absentes chez les invertébrés). Parmi les modèles animaux mammifères, les rongeurs sont les plus classiquement utilisés, permettant notamment l'accès aux lignées transgéniques de souris indispensables pour notre projet.

Réduction : les techniques sont choisies pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, lorsque c'est possible, nous utilisons des électrodes qui permettent de collecter plus de données par animal (réduisant le nombre d'animaux nécessaires). Nous utilisons également des rats pour les expériences qui ne nécessitent pas de souris, car les structures cérébrales sont plus grandes, ce qui diminue le taux d'échec potentiel (les autres expériences sont faites sur des souris obligatoirement pour utiliser les lignées transgéniques nécessaires au projet, qui n'existent pas chez le rat). Une analyse statistique appropriée est utilisée pour assurer suffisamment de données pour obtenir un résultat conclusif. D'après les données de la littérature et les standards actuels, nous estimons utiliser au maximum 358 animaux (20 rats et 338 souris) sur 5 ans.

Raffinement : les animaux sont hébergés et élevés dans une animalerie agréée, en condition de milieu semi-enrichi (avec du matériel fourni dans les cages pour fabriquer un nid). La douleur est

minimisée lors des chirurgies par l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques appropriés. Les implants utilisés ont été développés pour être bien supportés par les animaux. La stratégie expérimentale a été choisie pour diminuer le nombre d'animaux parkinsoniens nécessaires. Ainsi, la grande majorité des animaux du projet (~3/4) ne seront pas rendus parkinsoniens. Le bien-être des animaux est surveillé quotidiennement, et des critères d'arrêt sont définis si une souffrance ne peut pas être soulagée.

12521 Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin sont des maladies qui entraînent principalement une inflammation du côlon et qui se manifestent par des diarrhées et des saignements. Une fois déclarée, la maladie s'aggrave tout au long de la vie car aucun traitement n'a, à ce jour, été trouvé. Depuis de nombreuses années, les scientifiques cherchent, outre l'utilisation de médicaments ou d'interventions chirurgicales, à proposer aux malades des adaptations alimentaires pour limiter les rechutes.

L'objectif de ce projet est de déterminer si un ingrédient alimentaire d'origine végétale déjà utilisé comme colorant, peut limiter l'apparition de réponses inflammatoires dans le côlon. Ces réponses font intervenir différents types cellulaires, différents organes et sont donc trop complexes pour l'étudier sur des cultures cellulaires et par conséquent il est nécessaire de recourir à l'animal pour estimer la dose la plus efficace chez l'homme.

Le modèle choisi sera le rat car c'est un modèle bien connu dans l'étude de ces maladies et que nous pourrions collecter des échantillons biologiques de taille/quantité suffisante pour limiter le nombre d'animaux requis pour l'étude. Cinquante rats mâles de 6 semaines seront répartis en 5 groupes de 10 animaux. Ce nombre a été réduit au maximum afin de pouvoir réaliser des analyses statistiques pertinentes malgré une certaine variabilité inter-individuelle de la réponse). Trois groupes seront soumis à une colite expérimentale en absence ou en présence d'une faible ou d'une forte dose de l'ingrédient ; un groupe sera soumis à l'ingrédient seul à la plus forte dose et le dernier groupe servira de témoin. Le modèle de colite utilisé pouvant entraîner une perte de poids et un arrêt temporaire de la prise alimentaire qui cherche à être contrecarrés par le produit à tester, les animaux seront étroitement suivis. L'intensité de la douleur sera évaluée d'après un score établi selon une grille multiparamétrique d'évaluation de la douleur basée sur l'évaluation de l'évolution du comportement et de la réponse clinique du rat. Le score obtenu permettra de caractériser 4 niveaux de douleur (d'absence à sévère) et de mettre en œuvre un suivi différencié des animaux. Si les animaux souffrent d'une perte de poids supérieure à 20% sur 48H et un arrêt de la prise alimentaire de plus de 24H, ils seront exclus du protocole (douleur sévère) et euthanasiés. L'usage d'antalgiques ou d'anti-inflammatoires n'est pas envisageable car ne permettra pas de valider notre hypothèse. L'étude durera 21 jours et la colite sera initiée la dernière semaine du traitement par l'ingrédient étudié. Cette colite consiste en l'administration, dans le côlon d'animaux anesthésiés, d'un agent chimique entraînant une réaction inflammatoire. A l'issue de l'étude, les animaux seront euthanasiés afin de prélever des fluides biologiques et des organes qui seront ensuite analysés.

Les animaux seront hébergés en groupe et avec enrichissement du milieu. Toutes les mesures ont été prises afin de respecter les 3R.

12522 Les ganglions de la base sont un ensemble de structures cérébrales impliquées dans le contrôle moteur, la sélection de l'action et l'apprentissage des habitudes. L'importance des ganglions de la base est soulignée par la gravité des pathologies qui résultent de leur dysfonctionnement : maladie de Parkinson, de Huntington, addictions, troubles obsessionnels compulsifs. Le striatum est une structure des ganglions de la base, qui constitue la principale voie d'entrée : il reçoit des informations, du cortex cérébral et du thalamus, qu'il filtre pour extraire les informations pertinentes du "bruit de fond". Le striatum est composé de plusieurs sous-populations neuronales : tout d'abord les neurones principaux qui traitent les informations et les envoient aux structures cérébrales de sortie des ganglions de la base. Ils représentent 95% des neurones striataux et sont organisés en 2 sous-populations qui ont des effets opposés sur les structures cérébrales en aval et donc sur le comportement moteur. Le striatum contient également des interneurons locaux libérant différents neurotransmetteurs, comme le GABA ou l'acétylcholine. Les neurones principaux reçoivent des

entrées excitatrices (du cortex et du thalamus), et des entrées inhibitrices (par les réseaux locaux d'interneurones libérant le GABA). C'est grâce au traitement de ces informations par les neurones principaux du striatum que les ganglions de la base influent sur le contrôle moteur, la sélection de l'action et les habitudes.

Notre projet a un objectif scientifique : comprendre la dynamique entre l'excitation et l'inhibition reçue par les neurones principaux du striatum pendant l'exécution d'une tâche comportementale. Pour cela, nous réalisons des enregistrements électrophysiologiques de neurones principaux du striatum, chez la souris anesthésiée ou en train d'effectuer une tâche comportementale simple, en contention non douloureuse. Les enregistrements sur souris anesthésiée nous permettront de développer un algorithme mathématique qui "lira" en direct l'évolution des entrées excitatrices et inhibitrices. Pour les expériences chez l'animal éveillé, on implante tout d'abord (sous anesthésie) un dispositif qui permet la contention non douloureuse et la fenêtre d'accès au cerveau pendant le comportement. Les animaux sont ensuite progressivement habitués à la tâche, où ils doivent s'immobiliser dans un lieu précis pour obtenir une récompense sucrée. On effectue les enregistrements à divers moments de l'apprentissage de la tâche : quand l'animal est motivé par la récompense, ou quand la tâche devient simplement une habitude. Nous utilisons des souris transgéniques qui nous permettent d'identifier les 2 sous-types de neurones principaux du striatum, ou de moduler spécifiquement les entrées inhibitrices des réseaux locaux sur ces neurones. Les modifications génétiques dans ces lignées ne perturbent pas la physiologie des animaux, et sont complètement "silencieuses" (phénotype "non-dommageable"). Elles servent uniquement d'outil pour identifier ou moduler les neurones ciblés. Nos résultats permettront de mieux comprendre comment les entrées excitatrices et inhibitrices reçues par le striatum évoluent pour permettre l'expression d'un comportement soit flexible (motivé par la récompense), soit inflexible (habitude indépendante de la récompense).

Remplacement: il n'existe pas de modèle mathématique décrivant les dynamiques des réseaux neuronaux des ganglions de la base dans leur complexité, pendant l'exécution d'un comportement, d'où la nécessité d'avoir recours à des animaux vivants. Il est nécessaire d'utiliser un modèle animal mammifère pour obtenir des résultats potentiellement transposables à l'Homme, car les structures des ganglions de la base ne sont pas présentes, ou sont organisées différemment chez les autres vertébrés (et absentes chez les invertébrés). Parmi les modèles animaux mammifères, la souris est un modèle largement utilisé, permettant notamment l'accès aux lignées transgéniques indispensables pour notre projet.

Réduction : l'utilisation de souris transgéniques permet d'identifier directement les 2 sous-types de neurones principaux du striatum, ce qui est essentiel étant donné qu'ils ont des rôles opposés ; cela permet de réduire considérablement le nombre d'animaux, car l'alternative serait de marquer chaque neurone enregistré pour le retrouver et l'identifier après par une étude histologique, ce qui est extrêmement difficile techniquement, avec un rendement très faible, et nécessiterait donc beaucoup plus d'animaux pour obtenir les mêmes résultats. Une analyse statistique appropriée est utilisée pour assurer un nombre suffisant d'animaux par groupe pour obtenir un résultat conclusif. D'après les standards de la littérature actuels, nous estimons utiliser au maximum 370 animaux sur 5 ans.

Raffinement: les procédures expérimentales sont raffinées à chaque étape : les animaux sont hébergés et élevés en condition de milieu enrichi (avec du matériel pour faire un nid, un dôme pour se cacher et une roue pour jouer) dans une animalerie agréée. La douleur est minimisée lors de la chirurgie (utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques appropriés). Le bien-être des animaux est surveillé quotidiennement, et des critères d'arrêt sont définis si une souffrance ne peut pas être soulagée.

12523 Les vols spatiaux correspondent à une combinaison unique de stress qui a un impact négatif sur de nombreux systèmes physiologiques. Ainsi, les études réalisées sur les humains et les animaux ayant séjourné dans l'espace montrent que cet environnement extrême affecte les systèmes musculo-squelettique, vasculaire, cognitif et immunitaire.

Étant donné le peu de protocoles expérimentaux pouvant être réalisés sur des astronautes, le nombre réduit de ces derniers et des missions spatiales, divers modèles ont été développés pour modifier la gravité en laboratoire et ainsi comprendre comment de telles modifications affectent diverses fonctions physiologiques. Parmi ces modèles, l'exposition à un environnement hypergravitaire via l'utilisation d'un rotor est une méthode classiquement utilisée. Dans ce cadre, des grenouilles (*Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis*) et des salamandres (*Pleurodeles waltl* et *Ambystoma mexicanum*) adultes, achetés chez un fournisseur agréé, seront acclimatés durant 2 semaines dans des enceintes aquatiques où ils bénéficieront d'un enrichissement (présence de morceaux de tuyau en PVC afin qu'ils puissent s'y cacher). Ils seront ensuite utilisés afin de produire sur place des embryons/têtards qui seront soumis, via des rotors, à différents niveaux d'hypergravité (2 ou 3G) 24h/24H durant 3 à 4 semaines. Les embryons/têtards pourront également provenir de collaborateurs à la condition qu'ils soient intégrés à une autorisation de projet de ces collaborateurs. Par session expérimentale, 16 à 32 embryons/têtards seront répartis dans les huit aquariums d'un rotor afin que leur développement ait lieu en hypergravité. Le même nombre d'embryons/têtards sera réparti dans huit aquariums identiques mais non soumis à une modification de la gravité (groupe contrôle). Ces nombres ont été déterminés pour permettre d'avoir suffisamment d'animaux en fin d'expérience pour analyser de nombreux paramètres moléculaires et cellulaires et obtenir une puissance statistique suffisante pour obtenir des résultats significatifs (Réduction). Les animaux seront analysés soit immédiatement après l'arrêt du rotor, soit après une phase de récupération d'une durée maximale de 4 semaines, afin de savoir respectivement, comment une modification de la force gravitaire affecte leur développement, et/ou combien de temps il faut pour un retour à la normale. Un maximum de cinq sessions d'exposition à l'hypergravité par an est prévu sur des lots d'embryons/têtards différents. Pour ces études, il n'est pas possible d'avoir recours à des modèles cellulaires ou moléculaires car la réponse globale de l'individu est nécessaire (Remplacement non envisageable).

L'objet de la présente saisine est donc d'obtenir un agrément pour réaliser au maximum 5 sessions expérimentales par an sur des embryons/têtards issus d'une de ces 4 espèces d'Amphibiens en utilisant des protocoles standards validés par la communauté scientifique internationale (Raffinement). Ces 4 espèces sont proposées car la vitesse de développement de leurs embryons est différente ce qui permettra d'étudier les effets de l'hypergravité sur les stades précoces (avec *P. waltl* ou *A. mexicanum*) ou tardifs (avec *X. laevis* ou *X. tropicalis*) du développement animal. Le nombre d'animaux utilisés par session sera de 6 femelles adultes, 6 mâles adultes et maximum 64 embryons/têtards, soit un maximum de 380 animaux par an (30 femelles adultes, 30 mâles adultes et 320 embryons/têtards) et de 1900 animaux sur 5 ans (150 femelles adultes, 150 mâles adultes et 1600 embryons/têtards). Les 2 procédures correspondent à « Production d'embryons par fécondation in vitro » et « Exposition d'embryons d'Amphibiens à l'hypergravité (2 ou 3G) »

Condition d'hébergements :

Pendant la session, les embryons/têtards d'Amphibiens pourront être hébergés dans un des deux rotors disponibles.

Le premier possède 8 nacelles, chacune accueillant un aquarium contenant 0,5L d'eau. Pendant l'exposition à l'hypergravité, les embryons sont placés à une densité de 4 par aquarium. L'aération des aquariums, via des bulleurs, et la distribution de nourriture, via un système de distribution automatique, sont pilotés par ordinateur et les embryons sont surveillés par des caméras (une caméra par nacelle) fonctionnant aussi bien en visible qu'en infrarouge. Les conditions de température, d'éclairage (alternance classique jour/nuit de 12h/24h) et de ventilation de la pièce sont contrôlées au niveau de la pièce de l'animalerie. Le niveau d'eau est vérifié tous les 2 jours et celle perdue par évaporation est remplacée.

Le second permet d'accueillir 8 miniaquariums développés pour permettre le développement d'embryons d'Amphibiens à bord de la Station Spatiale Internationale (ISS). Chaque miniaquarium a une contenance de 64 mL d'eau. Deux embryons peuvent être placés dans chaque miniaquarium. L'aération est assurée par des membranes perméables à l'oxygène et au gaz carbonique. Ces membranes, imperméables pour l'eau évitent les pertes par évaporation. De plus, chaque aquarium dispose d'une circulation d'eau assurée par une pompe pilotée par ordinateur qui permet

l'élimination des déchets via le passage de l'eau dans un filtre à charbon actif. Quant à la nourriture, elle est progressivement fournie aux animaux de chaque miniaquarium à partir d'un réservoir piloté par une pompe osmotique. Ici, la surveillance des animaux est visuelle et assurée quotidiennement. A nouveau, les conditions de température, d'éclairage et de ventilation de la pièce sont contrôlées au niveau de la pièce de l'animalerie.

La température (20°C pour *X. laevis* et *P. waltl*, 24°C pour *X. tropicalis*, 18°C pour *A. mexicanum*) et la qualité de l'eau (pH, nitrites, nitrates...) sont contrôlées deux fois par semaine.

Points limites :

Les points limites menant à l'exclusion et à l'euthanasie (par surdose d'anesthésique dans l'eau) des adultes sont : léthargie ; inconscience ; immobilité ; mauvais état de la peau ; hémorragie ; position anormale ; réduction de la mobilité.

Les points limites menant à l'exclusion et à l'euthanasie (par surdose d'anesthésique dans l'eau) des têtards sont : mauvais état de la peau ; position anormale ; réduction de la mobilité.

12524 L'objectif de ce projet est d'identifier des composés chimiques ou biologiques qui pourraient être développés comme nouveaux médicaments dans le traitement de la bronchiolite et de l'asthme, ainsi que les complications respiratoires inflammatoires et infectieuses qui en découlent. En effet, l'arsenal thérapeutique actuellement disponible ne permet pas de soigner correctement ces pathologies pulmonaires. Le traitement chez le jeune enfant de la bronchiolite, maladie très contagieuse, se résume pour l'essentiel à des mesures symptomatiques pour diminuer la fièvre et lutter contre l'encombrement bronchique. Le traitement de l'asthme fait appel à des bronchodilatateurs en cas de crise, et à des corticoïdes inhalés en traitement de fond, mais ces deux classes de médicaments ont des effets indésirables bien documentés. De plus, la composante allergique de l'asthme rend difficile la mise en place de mesures de prévention et de contrôle de l'environnement.

Pour réaliser ce projet, un travail important est réalisé au préalable in vitro sur des cellules humaines, ceci dans le but de sélectionner les meilleures molécules à progresser. Cependant, étant donnée la complexité des mécanismes impliqués dans les pathologies pulmonaires inflammatoires, il est difficile de prédire le potentiel thérapeutique d'une molécule uniquement sur la base de résultats in vitro. Il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal qui reproduit les différents aspects de ces maladies du système respiratoire, afin de pouvoir évaluer in vivo les meilleurs composés identifiés.

Afin de déclencher les symptômes de la bronchiolite, le virus respiratoire syncytial humain (RSV) est administré à des souris afin de se rapprocher au plus près des conditions d'infection avec ce même virus chez l'homme. La plupart des animaux utilisés dans ce projet seront exposés à une ou deux administrations intra-nasales du virus RSV, le choix du nombre d'expositions au virus étant dicté par le degré d'inflammation recherché dans les poumons et le mécanisme d'action des composés à tester. Les signes cliniques attendus sont modérés (perte de poids transitoire consécutive à l'inflammation pulmonaire après l'infection au RSV).

L'asthme sera induit par des administrations intranasales répétées de poussière d'acariens, qui est un des allergènes domestiques majeurs responsable de l'asthme chez l'enfant et l'adulte. Il n'est attendu aucun signe clinique sur les animaux exposés.

L'administration combinée du RSV et de la poussière d'acariens permettra d'établir un modèle d'asthme exacerbé qui présente chez l'homme une résistance aux médicaments existants, et pour lequel de nouvelles approches thérapeutiques sont donc nécessaires (perte de poids transitoire consécutive à l'inflammation pulmonaire après l'infection au RSV).

Les composés chimiques ou biologiques à tester dans ces modèles pourront être administrés par toute voie/fréquence possible.

Une observation quotidienne des animaux sera réalisée afin de noter tout signe clinique anormal, et un avis vétérinaire sera demandé en cas de doute. En cas de signes cliniques de souffrance au-delà de ceux attendus, des points limites seront mis en œuvre.

Une analyse bio-statistique des données générées dans ce modèle rongeur est réalisée, afin d'inclure le minimum requis d'animaux par groupe pour obtenir une réduction significative de l'inflammation pulmonaire ou de la charge virale dans les poumons.

Ce projet nécessitera une utilisation moyenne de 1600 souris par an, soit 8000 animaux au total pour la durée totale du projet sur 5 ans.

12525 Les muscles contiennent une population de cellules souches, appelées cellules satellites, qui sont essentielles pour leur croissance post-natale, leur plasticité face à l'exercice et leur réparation en cas de blessure. Il est important de mieux comprendre comment les cellules satellites sont régulées, notamment car elles présentent un énorme potentiel thérapeutique pour soigner des myopathies. On sait que les signaux présents dans le micro-environnement des cellules satellites jouent un rôle fondamental pour contrôler l'état de ces cellules et l'homéostasie du muscle. L'objectif de notre projet est d'étudier le rôle de la voie de signalisation passant par le récepteur Fgfr4 dans le développement, la régénération et le métabolisme musculaires.

Les aspects physiologiques de ce projet imposent de le réaliser dans un modèle animal mammifère, et la souris présente tous les avantages requis pour ce projet. Ce projet est divisé en 4 procédures qui utiliseront au maximum 902 animaux issus de 2 lignées transgéniques. Le rôle du Fgfr4 et son mécanisme d'action dans la régénération musculaire est analysé en pratiquant des lésions musculaires qui induisent la régénération. Le rôle du Fgfr4 musculaire dans le métabolisme glucidique est analysé par des tests de réponse au glucose. Enfin, le rôle du Fgfr4 dans le développement du muscle est analysé par des études histologiques au stade embryonnaire.

Pour appliquer les 3R, les actions suivantes seront entreprises :

- Réduction du nombre d'animaux : Les animaux témoins sont générés dans les mêmes portées que notre génotype d'intérêt et sont autant que possible partagés lorsque plusieurs expériences peuvent être réalisées en parallèle. Des témoins sont également réalisés du côté controlatéral dans un même animal. De plus, les organes non utilisés après l'euthanasie des animaux peuvent être récupérés pour d'autres expériences ou pour générer des banques d'échantillons biologiques. Certains animaux sont aussi utilisés pour répondre à deux questions scientifiques différentes. Enfin, les nombres d'animaux par lot et de répétitions sont ajustés au minimum d'après les analyses statistiques précédentes de l'équipe.

- Remplacement : les questions physiologiques posées dans ce projet nécessitent de le réaliser dans un animal vivant, possédant du tissu adipeux brun. La souris a été choisie pour ces raisons, ainsi que pour les outils génétiques disponibles.

- Réduction de la souffrance animale et raffinement : Les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux sont privilégiés. Toute procédure pouvant générer une douleur est réalisée sous anesthésie et complétée par des analgésiques. Les souris sont surveillées quotidiennement, et des mesures sont prises pour enrichir leur milieu et réduire le stress animal. Aucun phénotype dommageable n'est attendu pour l'élevage des lignées utilisées. Des points limites sont définis pour mettre à mort les animaux en cas de maladie, de lésions ou de perte de poids.

12526 La peau forme la couche externe protectrice du corps dont l'intégrité doit être maintenue tout au long de la vie. Ainsi, les processus de cicatrisation cutanée sont initiés immédiatement après blessure et mettent en jeu la migration et la prolifération des cellules cutanées. Des défauts de cicatrisation (efficacité, rapidité) apparaissent avec le vieillissement, lors de pathologies (diabète) ou encore dans le cas de grands brûlés, et représentent un défi clinique majeur. Ce projet a pour but d'étudier l'effet de l'injection de nanoparticules naturelles produites par des cellules en culture sur la vitesse et la qualité de cicatrisation cutanée. Nos résultats in vitro montrent une amélioration de la migration des cellules avec un effet bénéfique à long terme potentiellement très intéressant. Nous souhaitons maintenant valider les effets in vivo.

Pour cela, nous utiliserons deux modèles murins : Un modèle de cicatrisation « normale » des souris adultes jeunes (8 semaines) et un modèle de cicatrisation ralentie des souris âgées de 24 mois. Le projet cible l'utilisation de nanoparticules naturelles afin d'améliorer les capacités de cicatrisation.

Pour cela, nous utiliserons des particules produites à partir de cellules humaines afin de pouvoir les détecter par discrimination d'espèce ainsi que des particules produites par des cellules murines afin de déchiffrer les mécanismes moléculaires impliqués. La procédure implique une biopsie cutanée avant injection des nanoparticules naturelles aux berges de la blessure. Ce projet met en évidence le transfert de matériel biologique par nanoparticule comme une nouvelle approche de thérapie ciblée localisée.

Ce projet ne générera aucune pathologie ou modification physiologique observable. Le phénotype attendu est une cicatrisation plus rapide. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs à partir d'un nombre minimum d'animaux. Ce projet a été construit en tenant compte des exigences de remplacement, réduction, et raffinement conformément à la réglementation éthique en vigueur : Remplacer : Aussi souvent que possible, les expériences seront réalisées *in vitro* sur des cellules en culture. Cependant, la complexité de la peau, de par la présence de nombreux types cellulaires d'origine embryonnaire différente, rend la reconstitution d'un environnement complet très difficile, c'est pour cela qu'il est essentiel de réaliser des expériences sur les souris. Réduire : Les groupes contrôles sont réduits au minimum en effet les conditions d'expérimentation sur des animaux de laboratoire permet une homogénéité du groupe. Raffiner : La procédure consiste à pratiquer une biopsie cutanée. Les animaux seront anesthésiés lors de la procédure et seront suivis quotidiennement afin d'anticiper tout stress et/ou douleur.

Le nombre total d'animaux impliqués dans ce projet est 402.

12527 La maladie de Parkinson est une pathologie causée par la dégénérescence progressive et chronique des neurones dopaminergiques (secrétant la dopamine, un neurotransmetteur) localisés dans la substance noire.

Les signes moteurs sont la rigidité, le tremblement, l'instabilité posturale et une réduction significative dans la capacité d'exécuter des mouvements volontaires (akinésie). Cependant, la maladie de Parkinson entraîne aussi des complications cognitives (principalement exécutives), de la dépression, des comportements compulsifs, de l'apathie, des troubles digestifs et des problèmes de sommeil entre autres. L'administration orale de dopamine (levodopa) peut pallier l'absence de synthèse de ce neurotransmetteur par les cellules dopaminergiques dégénérées pendant 5 à 8 ans. Passé cette période, la prise de levodopa plusieurs fois par jour entraîne une libération pulsatile de dopamine dans le cerveau créant des complications motrices secondaires sévères et invalidantes (dyskinésies) et exacerbe les troubles non-moteurs. Une libération de dopamine plus constante et physiologique pourrait éviter ce type de complication et prolonger la durée du traitement. La thérapie génique (utilisation d'un virus non-pathogène pour exprimer une molécule d'intérêt de façon continue à long terme) est en phase de test clinique pour la maladie de Parkinson. Les résultats sont encourageants mais l'essai en cours ne concerne que les aspects moteurs de la maladie.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de la thérapie génique sur les troubles non-moteurs de la maladie de Parkinson dans un modèle primate non-humain de la maladie. L'efficacité de cette stratégie pour corriger les symptômes moteurs a déjà été démontrée dans notre laboratoire sur ce même modèle. Le projet s'inscrit dans une démarche translationnelle. Il permettra, à terme, de valider au stade préclinique la possibilité de corriger les troubles cognitifs en même temps que les déficits moteurs, et ainsi d'améliorer la prise en charge et la qualité de vie des patients parkinsoniens.

Les primates non-humains étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité, dans des élevages reconnus. Leur nombre, qui s'élève à 16, a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données significatives afin d'évaluer l'effet du traitement à différentes doses. Le modèle primate non-humain se justifie par la possibilité d'évaluer les fonctions motrices et cognitives dans une espèce proche de l'homme, en utilisant des échelles et tests de comportement disponibles en clinique. De même, la résolution des images IRM et TEP permet d'appliquer le même suivi longitudinal chez l'animal et chez l'homme afin de disposer d'index prédictifs de la maladie et de sa progression avant, pendant et après traitement.

L'évaluation fonctionnelle sera menée en utilisant des techniques indolores et non-invasives telles que l'imagerie IRM et TEP, ainsi que l'étude du comportement moteur spontané et du comportement cognitif à l'aide d'écrans tactiles. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêt permettent de veiller au bien-être des animaux.

12528 Le carcinome hépatocellulaire, souvent causé par une cirrhose et lié à des perturbations du métabolisme hépatique, a un pronostic très sévère. L'agence internationale de recherche sur le cancer a indiqué que le travail posté provoquant une disruption circadienne pourrait accélérer la progression tumorale. Des études récentes ont permis de mettre en évidence un dialogue entre la flore intestinale et le rythme circadien, sans pour autant avoir identifié un lien de causalité au cours de cette pathologie. Nous nous proposons donc de mieux comprendre l'impact de la flore intestinale et du rythme circadien sur le développement du carcinome hépatocellulaire avant d'envisager une approche de chronopharmacologie visant à restaurer les interactions homéostatiques avec la flore intestinale.

Des données préliminaires de nos collaborateurs suggèrent un rôle de certaines protéines de l'immunité innée au niveau de l'épithélium intestinal au cours de la carcinogénèse hépatocellulaire par une éventuelle modulation de la composition de la flore intestinale en fonction du rythme nyctéméral. Cette hypothèse de travail sera testée en évaluant l'impact d'antibiotiques et de l'alimentation programmée sur le risque de carcinogénèse hépatique chez la souris.

Durant ce projet, un maximum de 324 animaux sera envisagé pour une étude pilote évaluant l'impact des antibiotiques et de l'alimentation programmée et l'influence d'un gène à l'articulation entre la flore le rythme circadien, dans un modèle de carcinome hépatocellulaire. Sous réserve de résultats encourageants, 4 autres études seront lancés successivement. Au total, 4860 souris seront utilisées au maximum pendant la période décrite de 5 ans, sous réserve de résultats prometteurs à confirmer par trois expériences indépendantes. Il s'agit d'un projet pilote qui sera étendu et redéposé si les résultats sont favorables et qui nécessitera plusieurs expérimentateurs. Ce nombre maximal d'animaux se justifie par les combinaisons de paramètres expérimentaux (comme l'heure des prélèvements) permettant l'étude des mécanismes d'intérêt.

Les procédures expérimentales respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. En particulier, les groupes seront constitués du minimum d'animaux nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Néanmoins, elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme). Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux par le suivi de la consommation de nourriture et d'eau et la prise en considération de signes cliniques mesurables (respiration, poids corporel).

12529 Le cerveau est constitué de neurones ainsi que d'un autre type cellulaire au moins aussi abondant appelé astrocytes et dont la morphologie est complexe. Alors que le rôle des neurones dans le fonctionnement cérébral est largement reconnu et étudié, l'implication des astrocytes et de leurs interactions avec les neurones et les vaisseaux cérébraux dans le contrôle des fonctions cérébrales dans un contexte normal ou pathologique reste très peu connu. Nous souhaitons étudier comment les fonctions astrocytaires sont modifiées dans un contexte physiologique tel que l'apprentissage.

Le conditionnement à la peur associant un contexte de lieu à un léger choc électrique est un test comportemental très bien caractérisé et qui est mis en place très rapidement chez la souris. L'apprentissage étant efficace, ce protocole permet de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Il est également peu douloureux très court et n'induit aucune lésion. Des études de la littérature ont déjà montré que la morphologie complexe des astrocytes des souris était modifiée par cette tâche mais les bases moléculaires de ces changements sont encore méconnues. Notre question est de comprendre comment le conditionnement à la peur modifie la biologie moléculaire

et la biochimie des astrocytes. Cette étude devrait nous permettre de comprendre comment les astrocytes s'adaptent et contribuent d'un point de vue moléculaire aux processus d'apprentissage. L'étude de la répercussion cellulaire et moléculaire d'un processus cognitif tel que l'apprentissage nécessite le recours à des animaux vivants et est impossible sur un modèle cellulaire in vitro (règle du remplacement).

Le nombre d'animaux utilisés inclus dans cette étude (150) a été réduit au minimum grâce au raffinement du protocole utilisé qui permet notamment d'obtenir une efficacité de la mise en place de l'apprentissage de quasiment 100%.

Ce nombre correspond à 5 expériences indépendantes comprenant chacune 3 groupes de 10 animaux: 1) contrôle ; 2) Choc sans conditionnement ; 3) Choc et conditionnement (apprentissage).

Ce nombre d'expériences indépendantes nous permettra d'obtenir des résultats interprétables statistiquement.

La procédure est peu douloureuse et rapide. L'intensité du choc électrique est calibrée au minimum pour pouvoir obtenir une réponse comportementale sans provoquer de lésion et il n'a jamais été décrit d'état limite pour ce protocole. Toutefois, les animaux seront surveillés quotidiennement après la procédure de conditionnement. Tout animal montrant un problème de confort suite au choc sera mis sous surveillance accrue. Une attention particulière sera donnée si l'animal se gratte, présente une plaie, ou montre des signes de douleur. Ceci sera surveillé sur une grille d'évaluation de la douleur (points limites).

12530 Le contrôle cérébral de la prise alimentaire est gouverné par 2 systèmes : le système homéostatique et le système de la récompense qui interagissent. Dans une étude récente nous avons pu mettre en évidence une forte réorganisation des transcrits des récepteurs GABA à la fois dans le Noyau Accumbens (NAc) (circuits de la récompense) et dans l'hypothalamus (circuits homéostatiques) suite à une malnutrition périnatale. Cette réorganisation GABA est fortement modulée au cours du temps, et persiste à l'âge adulte. La plasticité des circuits GABA est très peu documentée dans le cadre d'une modulation de la prise alimentaire et en particulier les interactions entre ces 2 circuits ? Quel est l'impact fonctionnel de cette modulation GABA dans les 2 circuits de contrôle de la prise alimentaire ?

Ces résultats intéressants nécessitent d'être confirmés et surtout approfondis par des approches fonctionnelles in vivo. Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes il va nous falloir utiliser une approche plus intégrée et plus complexe nous permettant d'appréhender la connectivité entre les différentes structures et l'impact fonctionnel de ces connexions dans le contexte de l'empreinte nutritionnelle. Notre hypothèse est la suivante : Les connexions GABA entre les circuits de la récompense et les circuits homéostatiques sont modulées par l'alimentation périnatale. Dans ce projet nous allons développer, au laboratoire la technique suivante : La combinaison de l'utilisation d'un adénovirus canin de type 2 (CAV-2) associé à la technologie DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drug) permettant d'activer ou d'inhiber une voie cérébrale spécifique chez le rat.

La première phase consistera à identifier les voies de projection entre ces 2 circuits en utilisant le virus CAV-2 – CRE GFP (traceur rétrograde). La deuxième phase, très dépendante de la réussite de la première, consistera à inhiber ou activer spécifiquement la voie d'intérêt mise en évidence dans la phase 1, par l'utilisation d'une combinaison de 2 virus : un virus CAV2 et un virus « DREADD » qui intégrera un récepteur à protéine Gs ou Gi, sensible à la Clozapine-N-Oxyde CNO, uniquement dans la voie d'intérêt.

Ce projet pilote validé scientifiquement et financé, est une étape primordiale avant le lancement d'un projet plus ambitieux permettant d'étudier l'impact d'une alimentation périnatale déséquilibrée sur le dialogue entre ces 2 structures.

Application de la règle des 3R :

Réduire : Nous avons calculé le nombre d'animaux minimum nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement interprétable (n=12 par groupe pour le comportement). En tenant compte

des 2 phases expérimentales, le nombre maximum de rats mâles utilisé sera de 120 individus. Ce nombre inclut la répétition de la phase 2 dont la réalisation sera dépendante de la réussite de la première compte tenu de l'aspect « pilote » de l'expérience. Nous utiliserons le même animal, autant que possible.

Raffiner : Les animaux seront hébergés au moins 2 par cage (sauf en post-opératoire et pour les périodes de comportement alimentaire) avec comme enrichissement du milieu de la cellulose leur permettant de déchiqueter, de jouer et un tunnel. La majorité des protocoles ne devrait pas entraîner de souffrance pour les animaux, cependant ils feront l'objet d'une visite quotidienne, y compris le week-end depuis la réglementation de 2010. Les chirurgies stéréotaxiques, qui elles pourraient engendrer un inconfort les jours suivants, seront réalisées par un personnel formé avec une grande expérience dans le domaine de la neurochirurgie. Elles feront l'objet d'une attention particulière, et l'usage d'analgésiques avant et après la chirurgie permettra de contrôler la douleur. L'espace de chirurgie respectera au maximum les recommandations d'asepsie nécessaire pour assurer des résultats reproductibles. Une grille comportementale pour chaque animal sera complétée avec des points limites à partir desquels les animaux seront pris en charges pour supprimer leur souffrance ou seront mis à mort si cette souffrance est trop importante (cf Annexe 1).

Remplacer : Il s'agit d'une étude visant à cartographier et moduler spécifiquement des voies de communications entre différents noyaux cérébraux. Hélas, il n'existe pas encore de méthode alternative permettant de rendre compte de la complexité des mécanismes physiologiques mis en place, comme des modélisations mathématiques ou des modèles in vitro.

12531 Les maladies respiratoires sont très répandues dans les élevages de porcs et résultent bien souvent de situations complexes impliquant plusieurs pathogènes. Le « complexe respiratoire porcin » (CRP), maladie multifactorielle des porcs, est associé à des infections séquentielles ou simultanées par plusieurs virus et/ou plusieurs bactéries à tropisme respiratoire. Parmi les virus, celui de l'influenza porcin (IP) et celui du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) sont particulièrement impliqués dans le CRP en France, dans la mesure où ils co-circulent dans les élevages, notamment en Bretagne (la première région productrice de porc) où ils sont très largement répandus.

Dans l'objectif de mieux contrôler le CRP en élevage porcin, il est nécessaire de comprendre les interactions entre ces différents pathogènes, ainsi que les réponses de l'hôte aux co-infections, comparativement aux mono-infections dues à un seul pathogène. A ces fins, il est nécessaire de disposer de modèles expérimentaux permettant de reproduire ces co-infections en conditions contrôlées. En ce qui concerne la co-infection SDRP/IP, les rares études expérimentales ont été réalisées il y a une vingtaine d'années et ces études ne concernaient que certains paramètres cliniques, lésionnels et virologiques. Les réponses immunitaires développées au cours de la co-infection n'ont été étudiées que de manière très limitée au niveau sanguin et n'ont pas été abordées au niveau du poumon (site principal de multiplication des deux virus). Par conséquent, de nouvelles investigations sont nécessaires pour mieux caractériser et décrire la co-infection SDRP/IP.

Dans ce contexte, les objectifs du présent projet sont d'évaluer aux niveaux pulmonaire et sanguin :
1/ l'impact d'une infection par le virus du SDRP sur une infection subséquente par le virus IP ;
2/ l'impact d'une infection à virus IP sur le devenir d'une infection à virus SDRP en cours.

Pour ce faire, nous mettrons en place une procédure expérimentale sur 24 porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) au cours de laquelle les animaux seront inoculés de manière séquentielle par le virus SDRP, puis par le virus IP huit jours plus tard. Les dynamiques d'infection des deux virus, ainsi que les réponses immunitaires (innées et adaptatives) développées par l'hôte face à ces deux infections dans le contexte des inoculations successives seront comparées aux dynamiques virales et aux réponses immunitaires observées suite à des mono-infections.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de données fiables et exploitables. Les porcs seront élevés en groupe (4 groupes de 6 porcs) et bénéficieront d'un enrichissement social, ayant à leur disposition des objets manipulables. Ils seront nourris et

abreuvés à volonté et feront l'objet d'un suivi clinique quotidien. Afin de diminuer l'inconfort des animaux, les prélèvements stressants (lavages broncho-alvéolaires) seront réalisés sous anesthésie générale. En cas d'atteinte de points limites préalablement définis, les porcs seront euthanasiés afin qu'ils ne souffrent pas.

Ce travail permettra de développer un modèle expérimental de co-infection SDRP/IP et de le caractériser de façon précise du point de vue immunologique et virologique, afin de mieux comprendre et décrire les interactions entre ces deux pathogènes. Ce modèle permettra par la suite l'évaluation des mesures de maîtrise du CRP telles que les vaccinations.

12532 Le projet s'intéresse à l'influence d'équipements et de pratiques de pêches innovants sur la survie des soles (*Solea solea*) rejetées en mer afin de limiter l'incidence des activités de pêche sur les écosystèmes marins. En effet, la nouvelle Politique Commune de la Pêche prévoit que les espèces pour lesquelles un taux de survie élevé aura été démontré scientifiquement pourront bénéficier d'une exemption à l'obligation de débarquement et être rejetées en mer afin de réintégrer le stock.

Le projet vise donc à comprendre le processus de réintégration des rejets dans l'écosystème afin d'être en mesure de proposer des pistes d'amélioration qui limiteraient l'incidence de la pêche sur les populations. Pour cela, il est nécessaire d'estimer le devenir des rejets après chalutage.

L'étude du devenir des soles rejetées permettra d'identifier les points critiques pour leur survie, que ce soit en termes de pratiques à bord ou de vulnérabilité induite par la pêche. Il est reconnu par exemple que le temps passé par les organismes hors de l'eau impacte leurs chances de récupération.

Un total de 270 soles en dessous de la taille commerciale (24 cm) seront utilisés dans le projet.

Une étude de l'état physiologique des individus au moment du rejet permettra d'identifier les états permettant une récupération et ceux pouvant être considérés comme létaux. Ainsi, la vitalité des individus sera évaluée visuellement et le stress des soles sera étudié sur 120 individus issus du chalut grâce à des marqueurs sanguins afin de mieux prédire leurs capacités de récupération une fois remis à l'eau. Le projet proposera en conséquence des propositions d'aménagements des pratiques de travail à bord pour favoriser au maximum les conditions permettant une récupération. De plus, les modalités de remise à l'eau seront étudiées afin d'éviter la prédation par les oiseaux qui intervient souvent lors des rejets.

Parallèlement, nous proposons d'évaluer la survie de 150 soles remises à la mer à l'aide d'une marque externe qui sera pistée par télémétrie. Cette forme élaborée de marquage fait partie des méthodologies recommandées par le Conseil International pour l'Exploration de la Mer dans le cadre du groupe de travail sur l'estimation de la survie des rejets de pêche (Conseil International pour l'Exploration de la Mer, 2014).

Notre étude répond aux critères des 3R:

Remplacement: Dans le cadre d'une étude destinée à caractériser les effets d'un chalutage sur la physiologie des soles, il n'est pas possible de faire appel à des méthodes de remplacement. En effet, les processus étudiés s'appliquent à l'organisme vivant, dans son intégrité et toute sa complexité.

Réduction : le nombre de poissons a été réduit au minimum grâce au recours à la télémétrie plutôt qu'au simple marquage traditionnel et défini au seuil de la pertinence scientifique et statistique, compte tenu de l'étendue de la variabilité interindividuelle des processus étudiés dans cette étude.

Raffinement : des mesures de raffinement seront mises en place à bord du chalutier, avec des viviers spécifiques bien oxygénés, afin de permettre aux animaux de récupérer du chalutage dans les meilleures conditions et leur permettre d'exprimer les meilleurs répertoires physiologique et comportemental possibles. A la sortie du chalut, les poissons en dessous de la taille réglementaire et présentant des blessures importantes (saignement abondant et/ou amputation de nageoires) seront considérés comme ayant atteint le point limite et seront euthanasiés. Les soles seront anesthésiées préalablement aux prises de sang. Toutes les euthanasies seront effectuées par surdose d'anesthésique, après sédation.

12533 De nombreux cancers développent une résistance à la chimiothérapie causant le décès des patients. Ce phénomène est un vrai problème de santé publique. La majorité de ces cancers contient des cellules initiatrices de tumeur qui présentent une résistance aux agents chimiothérapeutiques et sont responsables de récurrences et métastases. Patched, le récepteur du morphogène Hedgehog, est surexprimé dans la majorité de ces cancers. Nous avons découvert que Patched possède une activité d'efflux de drogues et confère, aux cellules cancéreuses qui l'expriment, la capacité de résister à certains agents chimiothérapeutiques telle la doxorubicine (dxr). Cette étude a permis de proposer Patched comme une nouvelle cible thérapeutique pour améliorer l'efficacité de la chimiothérapie sur les cancers surexprimant Patched (mélanome, sein, poumon, ovaires, colorectal, corticosurrénal).

Nous avons choisi comme modèles d'étude deux cancers particulièrement résistants aux traitements standards composés de plusieurs agents chimiothérapeutiques dont la dxr, et dont les prélèvements réalisés sur les patients montrent une expression de Patched : le mélanome et le cancer de la corticosurrénale. Dans ces modèles et par l'intermédiaire d'un criblage in vitro de plusieurs banques de petites molécules nous avons pu identifier une molécule, M80, inhibitrice de l'activité d'efflux d'agents chimiothérapeutiques de Patched. Nous avons ainsi montré que cette molécule augmente fortement la cytotoxicité d'agents de chimiothérapie vis-à-vis des cellules de mélanome et de carcinome corticosurrénalien in vitro. Actuellement, l'objectif majeur de ce projet est de confirmer que M80 offre un bénéfice thérapeutique in vivo et donc de valider son utilisation en combinaison de chimiothérapies dans des modèles précliniques.

Dans ce but, nous réaliserons un modèle de xénogreffe de carcinome corticosurrénalien et un modèle de xénogreffe de mélanome, via transplantation par voie sous cutanée de cellules tumorales humaines surexprimant Patched (H295R ou A375, respectivement) chez des souris immunodéprimées (nudes). Dans le respect de la règle des 3R et donc par souci de raffinement, cette phase de greffe sera réalisée sous anesthésie gazeuse (Vetflurane 3%). Après apparition des tumeurs, les souris seront réparties aléatoirement dans les différents groupes de traitements. Le volume tumoral sera alors mesuré au pied à coulisse pour évaluer la capacité de M80, inhibiteur de l'activité d'efflux d'agents chimiothérapeutiques de Patched, à inhiber la croissance tumorale de ce sous-type de cancer. Les résultats seront confirmés dans une seconde expérience ce qui implique que ce projet fera appel à 160 souris au total. Durant l'ensemble de ces procédures, afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 5 afin d'éviter le stress de l'isolement. Durant toute la durée d'un protocole, l'ensemble des animaux est observé quotidiennement, pesé 2 fois par semaine en temps normal et quotidiennement en cas d'apparition des premiers signes de détresse chez l'une des souris du protocole.

Ces études seront essentielles pour prouver l'efficacité thérapeutique de cette nouvelle molécule et ouvrir la route à de nouveaux traitements cliniques des mélanomes et des carcinomes corticosurrénaux.

12534 Les cancers de l'estomac représentent actuellement le 4ème cancer chez l'homme et le 5ème chez la femme dans le monde avec une augmentation de son incidence, notamment dans les pays en voie de développement. Son pronostic reste péjoratif avec une forte mortalité à 5 ans ($\approx 70\%$). Plusieurs stratégies thérapeutiques sont possibles dans l'arsenal de traitement, mais le schéma classique associe le plus souvent une chimiothérapie péri-opératoire avec une ablation chirurgicale secondaire de toute ou partie de l'estomac. La gravité de ce type de cancer est principalement due à l'apparition tardive des symptômes, l'agressivité de cancer et sa résistance fréquente pour les médicaments utilisés (dérivés de platine). En outre, les cliniciens sont souvent contraints d'arrêter le traitement à cause des effets secondaires importants tels que l'induction d'une forte atrophie musculaire, ou sarcopénie, facteur de pronostic péjoratif reconnu.

Malheureusement il n'existe à l'heure actuelle dans les cancers gastriques aucuns marqueurs reconnus (moléculaires ou d'imagerie) qui permettraient une caractérisation précise des sous-populations tumorales et la corrélation de ces différentes sous-populations à une réponse à la

chimiothérapie. Il en est de même pour la question de la sarcopénie. En partant de ce constat, nous proposons d'étudier par imagerie du petit animal (μ TDMX/ μ TEP) la sarcopénie et de corrélérer les résultats ainsi obtenus au traitement ou à l'évolution de la tumeur (morphologique, biologique et d'imagerie).

Cette partie de projet vise à suivre lors d'une étude longitudinale en imagerie μ TEP/ μ TDMX, chez la souris, les effets de nouveaux composés anticancéreux contenant différents métaux et traitements combinatoires qui montrent une meilleure efficacité contre le cancer, et qui provoquent en même temps moins ou pas de mécanismes de résistance aux médicaments et d'effets secondaires.

Les paramètres mesurés en imagerie μ TEP sont l'hypoxie cellulaire avec le traceur 18F-MISO ou 18F-FAZA ainsi que le métabolisme cellulaire avec le 18F-FDG lors d'une étude longitudinale de 4 semaines à raison d'une séance d'imagerie μ TEP/ μ TDMX par semaine.

224 souris seront utilisées dans cette étude.

La règle des 3R sera respectée :

Réduire.

Les chiffres indiqués dans le dossier (224 souris) représentent le nombre maximal d'animaux utilisés pour ces expériences. Ils correspondent au nombre minimum d'animaux utilisables par groupe en tenant compte de la variabilité individuelle des animaux afin de faire les tests statistiques (test de Mann Whitney)

Remplacer.

Les deux objectifs principaux de ce projet sont, pour étudier la fonction de la famille de p53 dans la progression du cancer gastrique et la résistance aux médicaments et de développer et d'explorer de nouvelles approches thérapeutiques. Même si, nous utilisons différentes lignées gastriques pour nos études, elles ne reflètent pas la complexité d'une tumeur, son microenvironnement et les effets secondaires de la drogue sur des tissus sains éloignés. À cet égard, afin de progresser dans notre compréhension du cancer gastrique et le développement de meilleurs chimiothérapies, les modèles de cancer de souris sont indispensables.

Raffiner.

Les animaux sont hébergés dans des conditions sanitaires contrôlées et de bien-être optimales (ex : carrés de coton pour la fabrication des nids, tunnelss). Les animaux sont surveillés quotidiennement par du personnel compétent. S'il y a apparition de signes de souffrance au cours de l'expérience (animaux prostrés, perte de poids, poils dégradés ...), les animaux seront traités contre la douleur par un traitement anti- inflammatoire ou euthanasier si leur état le nécessite. De même lors des séances d'imagerie les paramètres vitaux des animaux sont monitorés.

12535 La polyarthrite rhumatoïde affecte près de 1% de la population mondiale et se caractérise par une inflammation articulaire associée à la fois à des altérations cartilagineuses et osseuses et une douleur chronique. Le Nerve Growth Factor (NGF) semble une cible prometteuse dans son traitement mais son blocage est associé à des effets indésirables importants. Afin de préciser le rôle spécifique des voies de signalisation intracellulaires associées à l'activation du récepteur au NGF, TrkA, impliqués dans ces symptômes, nous nous proposons de réaliser une étude multimodale chez la souris. Pour cela nous allons utiliser un modèle de monoarthrite induite par l'administration intra-articulaire d'adjuvant complet de Freund chez des souris knock-in TrkA/C, exprimant un récepteur chimérique composé de la partie extracellulaire du récepteur TrkA et de la partie intracellulaire fonctionnelle du récepteur TrkC, récepteur de la neurotrophine -3, comparé à des souris sauvages. Ainsi, le NGF peut se fixer normalement à son récepteur TrkA mais active uniquement les voies spécifiques en aval de TrkC, récepteur peu ou pas impliqué dans la douleur inflammatoire. Ce modèle de souris pourra nous permettre d'étudier l'absence des voies de signalisation spécifiques de TrkA et donc ces conséquences sur la douleur articulaire inflammatoire. La monoarthrite sera induite à la fois chez des animaux knock-in TrkAC et sauvages à la fois mâles et femelles. Le comportement douloureux (douleur mécanique et thermique) sera suivi pendant 1

mois suite à l'induction de la monoarthrite. Afin de respecter la règle des 3Rs, un nombre minimale d'animaux, ne nuisant pas à la fiabilité statistique des résultats (80 au total, 40 pour chaque sexe), sera utilisé (réduction). Il devient aussi indispensable d'étudier la physiopathologie de la douleur dans les deux sexes, les mécanismes pouvant être différent et la prévalence de la douleur étant plus important chez la femme. En outre, l'utilisation de techniques de biologie moléculaire à haut débit permettra d'évaluer un très grand nombre de voies de signalisation avec un nombre relativement restreint d'animaux (remplacement) comparé à l'utilisation de techniques de biochimie classiques. Ce modèle a été choisi car il a déjà été largement utilisé pour étudier les mécanismes de la PR et que le développement de la pathologie est connu permettant un meilleur suivi des animaux afin de quantifier leur souffrance et ainsi de l'améliorer grâce à l'établissement de points limites définis (raffinement). A la fin de chaque expérimentation, certains tissus (articulation de la cheville et ganglions rachidiens de la moelle) seront prélevés afin d'étudier par des approches de biologie moléculaire et de biochimie, l'expression des différentes voies de signalisation en aval du récepteur TrkA. Ce projet devrait permettre de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques en aval de TrkA plus spécifiques permettant de réduire la douleur en évitant certains effets indésirables associés au blocage du NGF.

12536 Les coccidioses des volailles sont des affections très fréquentes dues à des parasites du genre *Eimeria*. Elles ont des conséquences économiques et sanitaires importantes, notamment dans les élevages de poulets (*Gallus gallus*). Si des mesures d'hygiène rigoureuse permettent de réduire le risque, elles sont le plus souvent insuffisantes. Bien que les approches prophylactiques actuelles par usage de coccidiostatiques par rotations successives connaissent un réel succès, l'incorporation de tels produits chimiques dans l'alimentation animale est largement remise en cause et continue de soulever des questions d'ordre sanitaire et sociétal. Avec l'émergence ces dernières années, de souches de plus en plus résistantes affaiblissant ainsi l'intérêt et l'efficacité de l'utilisation de telles molécules, il apparaît nécessaire de trouver de nouvelles stratégies de lutte contre la coccidiose. Selon la recommandation de la Commission Européenne, le développement et l'évaluation d'alternatives aux méthodes existantes sont nécessaires. Le but de cette étude est d'évaluer l'innocuité d'un vaccin déjà commercialisé dans plusieurs pays hors Union Européenne, afin d'enrichir les moyens de lutte contre les coccidioses. Elle fait partie d'un projet global dont l'objectif ultime passera par des études sur la sensibilité et l'efficacité des souches vaccinales dans le but d'obtenir un enregistrement dans l'Union Européenne. On sait depuis très longtemps que les parasites du genre *Eimeria* peuvent induire une forte réponse immunitaire chez les volailles. De plus, les récents progrès techniques (atténuation des parasites pour réduire leur pouvoir pathogène et meilleures méthodes de vaccination) ont rendu la vaccination plus acceptable que par le passé et plusieurs auteurs reconnaissent que la vaccination avec des oocystes est économiquement viable et pourrait constituer une alternative à la chimiothérapie. A l'heure actuelle, la vaccination reste la meilleure stratégie pour prévenir l'apparition des maladies infectieuses et le bénéfice est largement supérieur au risque.

Au cours de cette étape du projet, destinée à vérifier l'innocuité du vaccin, 160 poulets au maximum, seront vaccinés avec des doses 10 fois supérieures à la dose de référence avec différentes voies d'administration. Ainsi, un premier groupe de poussins sera vacciné par voie oculaire à 1 jour d'âge tandis que le second groupe sera vacciné par voie orale à 14 jours d'âge. Les poussins seront suivis quotidiennement pour l'observation de l'état général de santé pendant 28 jours. Pour l'ensemble des deux procédures, l'effectif a été calculé sur la base d'essais antérieurs afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en permettant de faire les tests statistiques adéquats. Les procédures ne devraient être à l'origine d'aucune souffrance. Les doses d'oocystes utilisées ne permettront pas d'induire un épisode de coccidiose avec des signes cliniques, mais plutôt une immunisation des animaux. Toutefois, si des signes étaient observés, ils ne devront pas dépasser les limites de tolérance établies, sans quoi une euthanasie compassionnelle sera réalisée. De nouvelles cages installées en 2017 permettent un meilleur raffinement dans l'hébergement, tel que la mise en place de perchoirs et de mobiles dans les cages, en plus d'un éclairage naturel

respectant le rythme circadien des oiseaux. Enfin, enfin de projet, les oiseaux seront euthanasiés un par un, après étourdissement par électronarcose.

12537 Notre vie quotidienne est une chaîne complexe et discontinue de décisions et d'actions qui définissent nos comportements. Face à une situation de choix, chaque individu tendra à sélectionner la meilleure action possible parmi l'ensemble des alternatives possibles. Ce processus de « prise de décision » intervient sur la base d'une évaluation subjective propre à chaque individu des coûts et bénéfices de chaque action. Le cortex préfrontal a émergé comme un acteur potentiel de ce processus. Les mécanismes synaptiques et neuronaux restent cependant peu connus à ce jour. Notre projet tirera partie des méthodes *in vivo* les plus modernes (optogénétique) afin de bloquer de façon spécifique et réversible le cortex préfrontal, et donc de déterminer les relations causales entre le traitement de l'information dans le cortex préfrontal et les comportements de prise de décision.

L'étude des mécanismes de la prise de décision est un enjeu sociétal et économique majeur des neurosciences modernes, comme le relèvent de nombreuses situations humaines inadaptées (prise de risque, addiction au jeu, compulsivité...). Par définition, ces mécanismes ne peuvent être étudiés que chez des animaux vigiles confrontés à une situation de choix. Dès lors, aucun des modèles *in vitro* ne peut être utilisé ici.

Au total, 140 souris seront utilisées dans notre projet. Pour le respect de la règle des 3R, la solidité de nos hypothèses de travail (vérifiée par des expériences pilotes), la nature innovante des méthodes utilisées (optogénétique), ainsi que la qualité de la mise en œuvre des procédures (basée sur une expertise reconnue de l'expérimentateur) permettra de réduire significativement le nombre des animaux. Les chirurgies se feront sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès le réveil de l'animal et qui sera maintenue tant que l'animal montre des signes de souffrance. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

12538 La production actuelle de foie gras est confrontée à des contraintes économiques et réglementaires importantes. L'alimentation représente la part la plus importante du coût de production. Lors de la phase de gavage, environ 10 kg de maïs sont nécessaires pour produire un foie gras de canard d'environ 550 g afin d'obtenir un foie gras de taille commercialisable et de bonne qualité sensorielle et technologique. Des travaux réalisés chez les mammifères et chez les poissons ont permis de démontrer la capacité des acides aminés à stimuler la synthèse des lipides et à inhiber les mécanismes de dégradation cellulaire.

Dans le cadre d'un projet visant à explorer la capacité de certains acides aminés à stimuler la synthèse du foie gras chez le canard, nous souhaitons comprendre en parallèle leurs mécanismes d'action sur l'accumulation de lipides dans le foie par l'intermédiaire de 2 procédures, décrites ci-dessous. Comme la plupart des nutriments, les acides aminés sont capables d'activer des réactions chimiques dans les cellules en contrôlant plusieurs molécules à l'intérieur même de la cellule ou à sa surface (récepteurs). Parmi les voies de communication que peuvent utiliser les acides aminés, on retrouve la voie TOR (impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires : prolifération, synthèse, croissance...). L'activation de cette voie participe au contrôle de nombreux gènes dont certains impliqués dans la lipogenèse (voie de synthèse des lipides qui permet la formation des lipides dans le foie et donc la formation du foie gras) ou la dégradation cellulaire. Les 2 procédures expérimentales sont les suivantes :

La première vise à inhiber cette voie TOR par injection intraveineuse de rapamycine (un immunosuppresseur, inhibiteur de la voie TOR). L'objectif sera d'évaluer l'implication de cette voie, cible des acides aminés, dans le développement du foie gras. Il s'agira d'effectuer chez des canards gavés une injection intraveineuse de rapamycine afin de bloquer l'activation de la voie TOR qui apparaît suite à un repas. Les résultats seront comparés à ceux obtenus chez des canards témoins

non traités. Nous observerons ainsi les conséquences du blocage de cette voie sur le métabolisme des lipides.

La seconde vise à étudier l'autophagie. L'autophagie (du grec αυτο : « soi-même », et φαγειν « manger ») désigne la capacité des cellules à digérer une partie de leur contenu pour libérer de l'énergie en situation de déséquilibre ou carence nutritionnelle et/ou stress énergétique. Nous souhaitons observer au cours de cette étude si l'alimentation distribuée aux canards en période de gavage affecte les protéines impliquées dans l'autophagie et module son activité. Pour ce faire, des canards gavés ou nourris sans gavage recevront une injection intraveineuse de chloroquine (un antipaludique qui bloque l'autophagie) et seront comparés à des canards témoins non traités.

Ces 2 procédures seront réalisées sur des canards mâles mulard (utilisé pour la production française de foie gras). Des mesures d'expression des gènes (qui permet la fabrication d'une protéine) du métabolisme lipidique, des analyses de la voie TOR, de l'autophagie, des activités enzymatiques, seront réalisées sur le foie, muscle et tissu adipeux. A ces mesures seront associés des paramètres plasmatiques ainsi que des analyses histologiques des foies.

Des mesures sont prises en compte afin de limiter au mieux le nombre d'animaux et assurer leur bien-être.

Remplacement : Pour atteindre les objectifs, il est nécessaire d'avoir recours à des animaux : il n'y a pas de méthode substitutive pour répondre à la question posée. Les effets physiologiques escomptés ne peuvent être observés qu'in vivo.

Réduction : Le projet utilise en tout 108 animaux âgés de 12 semaines (âge de mise en gavage habituel) et étudiés uniquement au 4ème repas, au terme duquel ils seront tous abattus.

Les effectifs ont été calculés de sorte à avoir 12 individus à chaque prélèvement pour la première étude afin de pouvoir observer un effet significatif sur les paramètres recherchés (il y aura une cinétique de 4 prélèvements autour du repas pour les témoins et les traités : soit $12 \times 2 \text{ lots} \times 4 \text{ temps} = 96$ canards).

Pour la seconde étude, plus exploratoire, il n'y aura que 3 individus par modalité (gavés/nourris sans gavage et traités/témoins) (soit $3 \times 4 = 12$ canards). Les données étudiées en microscopie électronique se limitant souvent à 3 individus par modalité étant donné la lourdeur des analyses.

Limiter davantage le nombre d'individus par temps de prélèvement ne permettrait plus d'analyser les données d'un point de vue statistique étant donné les variabilités interindividuelles.

Raffinement : Défauts de comportement, d'emplument, boiteries, blessures... seront surveillés quotidiennement pendant la phase d'élevage et de gavage. Si l'un de ces phénomènes apparaît, sa gravité sera analysée et les animaux traités en conséquence. Le gavage, comportant 2 repas journaliers, sera précédé d'une palpation du jabot afin d'évaluer si l'animal a digéré le repas précédent, sinon, il est prévu de distribuer une demi-ration voire annuler le repas. Les expérimentations étant réalisées sur le 4ème repas de gavage, le gavage ne durera pas plus de 2 jours. Ces 2 expérimentations sont classées en sévérité « légère ». Tous les canards seront euthanasiés à la fin de l'expérimentation. Les prélèvements (sang ou tissus) seront réalisés post mortem. L'euthanasie s'effectue par électronarcose (étourdissement par un courant électrique) suivie de saignée dans une salle d'abattage agréée.

12539 Un grand nombre d'études épidémiologiques et de nombreuses données expérimentales suggèrent que le développement de certaines maladies neurodégénératives peut être associé à l'exposition à des pesticides. Les principales substances actives qui ont été incriminées sont des produits qui ne sont plus autorisées. Cependant nous ne disposons pas d'information sur la plupart des substances actives actuelles, et nos travaux ont pour objet de développer des modèles qui seront utiles à des travaux d'expertise dans ce domaine. En particulier, nous cherchons à étoffer les arguments expérimentaux concernant la pertinence de 3 modèles rongeurs au regard des acteurs moléculaires associés au déclenchement et/ou à l'aggravation de la maladie de Parkinson et de la maladie d'Alzheimer.

Ce projet a pour objectif la mise en place d'une banque d'organes qui constituera une ressource pour la mise au point de nouvelles méthodes et/ou la mise à disposition de matériel de référence utile à nos futurs travaux expérimentaux. Le matériel biologique que nous souhaitons collecter comportera, outre une diversité de lignées de souris transgéniques et non transgéniques (3 lignées génétiquement modifiées et 5 lignées correspondant aux génotypes de contrôle), une grande diversité de tissus (cerveau, intestin, estomac, pancréas, yeux, liquide céphalo-rachidien, plasma/sérum). Afin que les organes soient exploitables avec un maximum de méthodes les animaux seront anesthésiés puis perfusés par voie intracardiaque (procédure N°1), prélevés de leur sang par ponction cardiaque (procédure N°2) ou prélevés de leur liquide céphalo-rachidien (procédure N°3). Ce projet, sur 5 ans, concerne 80 souris par lignée et par procédure, soit un total de 1920 souris.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R « Remplacer, Réduire, Raffiner » seront les suivantes :

- Les animaux ne seront pas produits spécifiquement pour ce projet, ils correspondent exclusivement à des animaux de réformes produits et/ou hébergés au sein de notre élevage.
- Les résultats générés à partir de ces prélèvements permettront de réduire le nombre d'animaux qui sera nécessaire dans nos futures expérimentations, tant par l'amélioration des méthodes d'analyses, que par la mise à disposition de matériel biologique de référence.
- L'exploitation de cette banque pourra nous aider à raffiner nos futures expérimentations en nous permettant d'identifier de nouveaux critères d'interruption (ou "end-points") précoces.
- Les procédures mise en place pour la collecte des organes se feront sous anesthésie générale sans réveil des animaux.

12540 L'autisme est caractérisé par une communication sociale atypique, ainsi que des comportements stéréotypés et des intérêts restreints. Cette maladie touche plus d'une personne sur 100. Les gènes associés à l'autisme codent principalement pour des protéines de la synapse, la zone de contact entre les neurones qui permet la transmission du signal nerveux. Nous nous attachons à comprendre les mécanismes moléculaires à la base des comportements atypiques observés chez les personnes avec autisme. Les marqueurs de l'autisme sont principalement comportementaux en l'état actuel des connaissances, ce qui implique que l'étude des mécanismes de l'autisme ne peut se faire que sur l'animal vivant. Notre projet « La communication sociale chez la souris – applications aux modèles d'autisme » vise donc à étudier le comportement de souris chez lesquelles on a inactivé un des gènes associés à l'autisme (modèles murins de l'autisme) et nous comparons ce comportement à celui de souris contrôles (même âge, même sexe, même fonds génétique mais ne portant pas de mutation dans les gènes associés à l'autisme). Notre objectif est de déterminer les mécanismes associés aux déficits comportementaux présents dans l'autisme. Ce projet est un projet de recherche fondamentale qui a pour vocation de contribuer à la compréhension des mécanismes à l'origine de l'autisme. Nous étudierons des modèles murins portant des mutations à l'état hétérozygote (une seule des deux copies du gène est mutée) associées à l'autisme, pour comprendre le rôle de gènes modulateurs. De tels modèles robustes à l'état hétérozygote font actuellement défaut et pourtant ils représentent la base pour des essais de traitements qui permettraient d'augmenter l'expression de la copie normale du gène. Ils sont générés dans un projet parallèle « Génération et caractérisation phénotypique de nouveaux modèles murins de l'autisme ». Sur ces modèles, nous identifierons des mécanismes reliant les mutations génétiques aux troubles comportementaux via l'imagerie fonctionnelle cérébrale, l'histologie et la localisation dans le cerveau des sites d'expression des gènes associés à l'autisme.

Nous avons choisi la souris car c'est une espèce qui peut être facilement modifiée génétiquement et dont le comportement est suffisamment connu pour être étudié en tant que modèle de l'autisme. Nous nous concentrerons principalement sur les anomalies de la communication sociale, tout en examinant les autres comportements tels que la locomotion, l'anxiété, les réponses aux stimulations sensorielles et les comportements stéréotypés. Les animaux seront suivis en permanence. Les caractérisations comportementales seront réalisées dans de grands environnements

d'hébergement, avec une intervention minimale des expérimentateurs. Sur la totalité du projet, nous prévoyons d'utiliser 2452 souris mâles et femelles sur 5 ans. Les animaux seront testés aux stades souriceau et juvénile et à l'âge adulte. Nous avons réduit au minimum le nombre d'animaux qui devront être utilisés en ajustant au mieux les protocoles expérimentaux et en réalisant, en collaboration avec un biostatisticien, des analyses statistiques pour obtenir des résultats robustes tout en tenant compte de la variabilité inter-individuelle des animaux testés. Les expériences réalisées dans la procédure 1 (1200 souris) ne sont pas considérées comme invasives et n'engendreront qu'un stress limité et très ponctuel. Cette procédure est donc considérée comme légère. La procédure 2 (212 souris) inclut une chirurgie sous anesthésie et analgésie et est donc considérée comme modérée. La procédure 3 inclut des tests vestibulaires et auditifs ; elle concerne 1040 souris et est classée comme modérée. Les animaux seront hébergés en groupes stables, pour respecter leur vie sociale. Aucun des tests n'engendrera de conséquences durables sur les animaux. Les animaux seront suivis régulièrement pour détecter immédiatement des signes cliniques (e.g., perte de poids, fourrure abîmée, blessures) ou comportementaux (e.g., prostration, agitation) de mal-être. Les animaux seront alors sortis de la procédure expérimentale et traités ou mis à mort.

12541 Ce projet constitue une étude comparée, entre l'homme et le primate non-humain, des mécanismes cérébraux de la communication vocale. Par exemple, la reconnaissance des vocalisations de ses congénères et de leur identité est une faculté que l'on partage avec les primates non humains. Ceci n'est pas surprenant compte-tenu de l'importance de telles capacités cognitives pour créer et maintenir des interactions sociales. Sans compter l'impact d'une telle étude sur notre connaissance des processus cérébraux de la communication et de ses dysfonctionnements (autisme, prosopagnosie, phonagnosie...), ce projet participerait grandement à la recherche sur les origines du langage, aujourd'hui en plein essor. Le langage humain se serait-il développé à partir d'une communication non verbale plus primitive ? Pour répondre à une telle question il est nécessaire de distinguer ce qui est spécifique à l'homme de ce qui est aussi présent chez des espèces phylogénétiquement proches, tels que les primates.

L'IRM fonctionnelle est une méthode idéale pour ce projet puisqu'elle a fait l'objet de nombreuses publications sur la perception de la voix chez l'homme, qu'elle faciliterait donc la comparaison inter-espèces dans le cadre de son utilisation chez le primate non humain (PNH), et qu'elle n'est pas invasive. Nous avons pour objectif d'utiliser cette technique chez le macaque Rhésus (n=5) éveillé, dans un protocole de stimulation auditive passive. Notre étude permettra à la fois de comparer nos résultats avec ceux des études plus invasives, par exemple à l'échelle cellulaire, chez le PNH, et avec celles non invasives réalisées chez l'homme en IRMf. Le macaque Rhésus est une espèce très utilisée en Neurosciences, notamment parce que ces animaux possèdent des systèmes perceptifs visuel et auditif globalement similaires à ceux de l'homme tant sur le plan structural que fonctionnel.

Notre projet satisfait aux exigences de raffinement et de réduction de l'expérimentation animale notamment grâce aux points suivants :

Utilisation d'une technique non invasive (IRM)

Utilisation d'un modèle animal (macaque Rhésus) indispensable du fait de sa proximité avec l'homme malgré des différences comportementales/ Intérêt majeur pour l'étude de l'origine du langage/ Littérature importante concernant l'anatomie cérébrale du macaque permettant une comparaison plus aisée avec l'homme.

Réalisation d'un protocole d'entraînement adapté afin de minimiser le stress de l'animal.

Entraînement par renforcement positif

Exposition limitée aux produits anesthésiants car pratique de l'IRMf chez l'animal éveillé (et sans aucun traitement douloureux). Par ailleurs, si l'entraînement n'aboutit pas, une anesthésie minimale sera envisagée afin d'éviter un entraînement abusif, stressant pour l'animal et inutile pour notre étude.

Réduction du nombre d'individus utilisés au minimum nécessaire pour publier les travaux et réaliser des tests statistiques.

Utilisation d'animaux ayant déjà participé à des expérimentations dans d'autres équipes de recherche.

Exploitation maximale du temps expérimental (dans le scanner) en réalisant plusieurs techniques de traitement (imagerie anatomique, fonctionnelle et de diffusion)

La règle de remplacement ne s'applique pas dans notre cas puisque l'intérêt est justement d'étudier le modèle animal le plus proche de l'homme. De plus, des modèles mammifères moins « évolués » ne seraient pas adéquats, par

manque crucial de littérature sur ce sujet d'une part, et par des incompatibilités techniques d'autre part.

12542 Un anticorps est une molécule du système immunitaire reconnaissant des éléments de l'organisme comme du non-soi (antigènes). Produit naturellement par celui-ci, il est un élément essentiel pour répondre à une attaque contre l'organisme. Les scientifiques ont eu l'idée il y a plusieurs décennies de fabriquer de telles molécules en choisissant des cibles d'intérêt thérapeutique, notamment des cibles impliquées dans des cancers. L'utilisation d'anticorps thérapeutiques a révolutionné le traitement de nombreuses pathologies.

Dans le cadre d'une collaboration, notre laboratoire participera au développement d'une plateforme de design et d'ingénierie d'anticorps dits monoclonaux dirigés contre des protéines membranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), cibles majeures de très nombreux médicaments à base de petites molécules mais contre lesquelles il existent peu d'anticorps.

Malgré les périodes de scepticisme qui ont marqué le développement des anticorps thérapeutiques on se rapproche progressivement des « balles magiques » dont avait rêvé Paul Ehrlich au début du XXème siècle, ces médicaments qui cibleraient spécifiquement les tissus malades sans affecter les tissus sains. En effet, l'un des modes d'action des anticorps est de se fixer sur des protéines membranaires exprimées spécifiquement (ou surexprimées) à la surface des cellules malades et de déclencher ainsi une cascade de phénomènes conduisant à la mort de ces cellules ; et de ces cellules uniquement. En se fixant à des récepteurs qui ne seraient exprimés qu'à la surface de cellules malades (comme les cellules cancéreuses), certains de ces anticorps attirent des agents de notre système immunitaire qui, in fine, vont se charger de l'élimination de ces cellules sans que les cellules saines ne soient affectées

Cette plateforme a pour objectif de se positionner comme un acteur des thérapies ciblées, dans un premier temps dans le traitement des cancers et en particulier des tumeurs solides.

Pour ce projet, le recours à l'animal est nécessaire, car aucun système synthétique ne rivalise (avec l'utilisation d'animaux) pour produire des anticorps de très haute affinité et spécificité pour une utilisation à visée thérapeutique ou diagnostique humaine.

Nous devons donc immuniser des souris. Cela consiste à leur injecter un antigène d'intérêt thérapeutique ou diagnostique afin de stimuler leur système immunitaire qui va alors produire des anticorps dirigés contre l'antigène utilisé.

Les animaux seront immunisés par la technique dite « d'immunisation génique ». L'immunisation génique consistera à injecter directement dans le muscle squelettique les gènes codant des protéines à l'animal sous anesthésie. L'organisme hôte produira lui-même l'antigène qui va induire une réaction immunitaire cellulaire et humorale. Par la suite, des rappels cellulaires (injection de cellules exprimant le récepteur d'intérêt thérapeutique ou diagnostique) seront réalisés afin d'amplifier la réponse du système immunitaire contre le RCPG d'intérêt.

Ce protocole, permet d'induire une très forte production d'anticorps. Celle-ci est suivie tout au long du protocole grâce à des prélèvements sanguins qui seront par la suite analysés afin de suivre la réponse immunitaire.

Une fois que la réponse immunitaire a atteint un niveau satisfaisant (titre en anticorps jugé suffisant), les cellules productrices d'anticorps (splénocytes) sont « récoltées » (prélèvement de la rate de l'animal) puis fusionnées avec un myélome afin de les immortaliser et de pouvoir les cultiver in vitro afin de produire les anticorps sélectionnés.

Le nombre d'animaux utilisé pour ce projet sera au maximum de 250 souris en 5 ans.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés et sont nés et élevés en captivité. Leur nombre (50 rongeurs par an) a été réduit au minimum nécessaire tout en restant suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées et permettra de cibler entre 5 et 10 récepteurs par an.

Le bien-être des animaux est assuré, durant l'élevage, par le suivi quotidien des animaux par un personnel qualifié et compétent et la constitution de groupes sociaux d'animaux. Notamment, les animaux seront hébergés en groupe dans une cage enrichie avec des accessoires de jeu et du matériel pour la fabrication de nids. Des critères d'arrêt d'expérimentation ont été réfléchis et seront appliqués afin d'empêcher toute souffrance animale.

12543 La maladie de Parkinson (MP) est une atteinte neurologique chronique dopaminergique, qui induit notamment d'importants troubles moteurs. Deuxième pathologie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer, la MP touche près de 6,5 millions de personnes dans le monde. Les thérapeutiques actuelles permettent d'atténuer les symptômes, mais aucune d'entre elles ne ralentit le développement de la pathologie.

La protéine α -syn, sous sa forme toxique, joue un rôle clef dans le développement de la MP. Aujourd'hui, il n'existe pas de modèle animal reflétant la mise en place de la MP, permettant de déterminer les mécanismes impliqués dans cette dernière et de tester efficacement de nouvelles thérapies. C'est pourquoi, nous avons entrepris le développement d'un modèle animal chronique innovant, basé sur l'administration quotidienne, par voie intranasale qui est indolore et non invasive, de la forme toxique de la protéine α -syn, susceptible de mimer la progression de la MP chez l'Homme.

Chez l'Homme, seule la récupération fonctionnelle des troubles moteurs, grâce aux médicaments antiparkinsoniens (L-Dopa, qui palie la perte de dopamine), permet de confirmer le diagnostic de la MP.

Le premier volet de notre projet actuel, a donc pour but de confirmer que notre modèle animal murin est sans conteste un modèle animal parkinsonien en évaluant la réponse locomotrice des animaux après administration de médicaments antiparkinsoniens.

Par ailleurs, au moment du diagnostic de la MP chez les patients, 50 à 70% des neurones dopaminergiques ont déjà dégénéré. Il est donc nécessaire d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes intervenants dans la mise en place et la progression de la MP pour tenter d'obtenir un diagnostic plus précoce.

Notre second objectif est donc de déterminer grâce à notre modèle le potentiel de nouvelles approches d'imagerie non invasive, en tant qu'outil diagnostique précoce de la MP.

Enfin de nombreuses études soulignent le caractère neuroprotecteur de la lumière selon sa longueur d'onde dans le cadre de la MP. Notre troisième objectif est de déterminer les potentiels mécanismes de neuroprotection induits par cette lumière ainsi que son efficacité au cours de la progression de la maladie, afin d'optimiser le traitement des patients atteints de la MP.

L'étude se fera en comparant des animaux contrôles à des animaux exposés à l' α -syn, qui seront ou non exposés à une illumination, et nécessitera l'utilisation de 480 souris, provenant d'élevages autorisés, afin d'assurer la validité des expériences menées.

Nous mènerons nos études dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer : Il n'existe pas de modèle non biologique ou in vitro permettant de réaliser ces travaux sans perte d'informations scientifiques.

Réduire : afin de limiter le nombre de lots expérimentaux et compte tenu que les expériences ne sont pas de classe sévère, des cohortes d'animaux pourront être utilisées pour répondre à plusieurs

objectifs. De plus, le nombre d'animaux pourra être réduit jusqu'à 50% dans certaines procédures si l'effet attendu est suffisamment important pour obtenir des résultats statistiquement fiables avec la première moitié d'animaux ou si les données se révèlent non pertinentes (arrêt alors des expérimentations).

Raffiner : Les souris seront hébergées à l'animalerie en groupe sociaux, dans un environnement enrichi adapté à leur espèce. De plus, toutes les procédures réalisées sur les animaux vigiles (administration de l' α -syn, illumination et tests comportementaux) sont indolores et elles seront effectuées par des personnes expérimentées et formées. Les séances d'imagerie des animaux se feront sous anesthésie générale gazeuse, ils seront placés sur un tapis chauffant pour maintenir leur température et un gel ophtalmique sera appliqué afin de limiter leur inconfort. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et tout sera mis en œuvre afin que les animaux aient un niveau d'inconfort aussi limité que possible. En cas d'effets inattendus, de perte importante de poids ou d'observation d'un phénomène douloureux, le vétérinaire en charge du bien-être des animaux sera immédiatement alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider de l'interruption de l'expérimentation.

12544 Notre projet de recherche prévoit d'utiliser un modèle animal (*M. musculus*, souche 1500015O10Rik) pour découvrir le rôle d'une famille de petites protéines codées par le gène *Ecrg4* dans la physiopathologie de maladies humaines fréquentes telles que l'hypertension artérielle, les troubles du rythme cardiaque et l'ostéoporose. Notre projet vise à caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'origine de ces maladies et à mettre au point des nouveaux outils thérapeutiques basés sur les résultats de nos recherches. Le gène *Ecrg4* a été inactivé par recombinaison homologue dans la lignée utilisée, qui n'a pas de phénotype dommageable. Les procédures expérimentales utilisées dans le cadre de ce projet seront de classe légère (administration de régimes enrichis ou appauvris en sodium ou potassium, respectivement, injections i.p., prélèvements sanguins) ou sans réveil (perfusion intracardiaque sous anesthésie).

Le nombre d'animaux qui sera utilisé pour ce projet de recherche est fixé à 780. Le projet sera conduit suivant la règle des 3R :

- réduire: des tests statistiques seront appliqués à l'analyse des résultats issus des Procédures 1 et 2 afin de limiter à l'essentiel le nombre d'animaux utilisés. Egalement, des animaux des deux sexes seront utilisés dans le projet, dans le double souci de récolter des données les plus possibles complètes et significatifs biologiquement ;

- raffiner: les animaux seront hébergés dans un milieu enrichi, avec température et hygrométrie contrôlée et seront suivis quotidiennement par le personnel de notre animalerie et par les personnes en charge du projet. Deux procédures seront de classe légère et une sans réveil. Une fiche de suivi sera utilisée pour monitorer l'atteinte du point limite au-delà duquel les procédures seront interrompues et les animaux euthanasiés ;

- remplacer: ce projet d'expérimentation animale a été précédé par des études *in vitro* qui ont permis de caractériser biochimiquement les protéines qui sont l'objet de notre étude. Néanmoins, malheureusement aucun système *in vitro* ne permet de reproduire l'ensemble des mécanismes physiologiques d'un organisme entier.

12545 Grâce à de nombreuses expériences conduites en culture et chez l'animal, les canaux ioniques ASIC (Acid-sensing ion channels) sont maintenant connus pour participer à la détection de la douleur acide par les terminaisons nerveuses sensorielles périphériques, par exemple au niveau de la peau, des muscles ou des organes. Dans le but de mieux comprendre le rôle dans la douleur pathologique d'un sous-type de canal ASIC encore très mal connu, le canal ASIC1b, nous avons réalisé des expériences sur des canaux ASIC exprimés dans des lignées cellulaires en culture, puis sur des cultures primaires de neurones sensoriels de rats et souris. Nous avons mis ainsi en évidence une nouvelle propriété de régulation des canaux ASIC par une enzyme intracellulaire présente dans les neurones: la kinase JNK qui peut être activée par des médiateurs inflammatoires et douloureux. Pour savoir si cette voie de régulation des canaux ASIC a une importance dans la

perception de la douleur, des expériences de comportement et de pharmacologie chez la souris sont maintenant nécessaires.

Pour cela, la douleur aigue cutanée acide sera induite localement par une injection sous-cutanée d'une solution acide dans la paume d'une patte arrière. Le comportement spontané de la souris sera chronométré (léchage, secouage, levés de patte), et les effets d'injections locales sous-cutanées dans la patte d'un activateur de la kinase JNK, d'un inhibiteur de la kinase JNK, de deux inhibiteurs des canaux ASIC et d'un médiateur physiologique (TNF alpha) activant la kinase JNK seront testés.

Le calcul statistique de puissance nous conduit à prévoir 15 souris/condition. Si la distribution des résultats est statistiquement normale nous utiliserons des tests paramétriques. Dans le cas contraire nous utiliserons des tests non paramétriques. En prévoyant 15 lots expérimentaux incluant 5 conditions, et à raison de 15 souris dans chaque condition, 1125 souris seront nécessaires au maximum (les conditions rendues inutiles par les résultats expérimentaux ne seront pas testées).

Le test comportemental induit une douleur par injection sous-cutanée locale dans une patte arrière d'une solution acide modérée (pH supérieur à 5). Cette douleur est connue pour être transitoire et ne durer que quelques minutes. Comme nous désirons étudier des régulations de cette douleur, nous ne pourrons pas la limiter par des analgésiques. L'injection de solution acide sous-cutanée locale produisant une douleur immédiate, nous ne pouvons pas non plus effectuer cette injection sous anesthésie. Mais, chaque souris étant observée en permanence par un expérimentateur, un comportement anormal suite à une injection dans la patte arrière (seul geste invasif effectué) sera immédiatement détecté, et l'animal sera euthanasié s'il apparaissait être en détresse (vocalisations, convulsions, détresse respiratoire), avant la durée maximale du test fixée à 20 min. Notre équipe ayant une longue expérience en expérimentation animale sur des modèles de douleur, nous savons cependant par expérience qu'une injection locale sous-cutanée dans la patte par elle-même (solution saline véhicule) n'induit normalement pas de comportement douloureux spontanée, ni d'effet secondaire systémique massif nécessitant une euthanasie.

Objectif de Remplacement: le maximum d'expériences préliminaires a été réalisé sur des lignées cellulaires, puis sur des neurones de rongeurs en culture, avant de planifier les expériences chez la souris qui sont nécessaires à la détermination de la réalité physiologique dans le contexte intégré d'un organisme vivant.

Objectif de Réduction: les procédures expérimentales prévues intègrent des conditions choisies d'après les résultats obtenus sur des cellules en culture (concentrations d'agents pharmacologiques, délais d'action etc...) participant ainsi à l'objectif de Réduction en réduisant le nombres de conditions à tester. L'objectif de Réduction est également pris en compte en prévoyant une chronologie des expériences qui permettra de ne pas réaliser les expériences rendues inutiles par les résultats précédants. Par exemple, un résultat négatif de la procédure 2 rendrait inutile la procédure 3.

Objectif de Raffinement: la prise en compte de la longue expérience de notre groupe dans les études des mécanismes de la douleur chez l'animal nous permet de proposer un test de douleur avec un impact modéré, restreint localement (injection sous-cutanée dans une patte) et induisant une douleur acide rapide et transitoire (environ 10 min). Les souris subissent une contention brève pour réaliser les injections puis sont laissées libres de leurs mouvements pendant le test. Elles sont habituées à la contention et à leur environnement au préalable, mais, puisque la douleur est ce que nous mesurons, elles ne peuvent cependant recevoir d'analgésique ni d'anesthésiques. Les souris sont euthanasiées à la fin du test qui ne dure au maximum que 20 min. Bien qu'aucun effet systémique massif et nocif ne soit attendu d'une injection sous-cutanée dans la patte (seul geste invasif effectué), et les souris restant sous l'observation visuelle constante de l'expérimentateur pendant le test, tout comportement traduisant une détresse ou une souffrance exagérée (vocalisations, détresse respiratoire, convulsions, troubles moteurs généralisés) conduirait à l'euthanasie de l'animal. Une douleur persistante, même d'intensité modérée, serait interrompue par euthanasie au bout de 20 min.

Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes neuronaux de la douleur, de proposer les canaux ASIC comme de nouvelles cibles thérapeutiques ainsi que les inhibiteurs de ces canaux et de la kinase JNK pour développer de nouveaux composés anti-douleur.

12546 La première identification de la maladie à virus de Marburg (anciennement appelée « fièvre hémorragique de Marbourg ») date de 1967, lors d'une épidémie qui s'est déclarée à Marburg, à Francfort (Allemagne), ainsi qu'à Belgrade (Serbie), après que des singes infectés aient été importés d'Ouganda. Le virus responsable de cette maladie grave, souvent mortelle, appartient à la même famille que le virus Ebola. Ces virus sont parmi les agents pathogènes les plus virulents chez l'homme. Bien que ces deux maladies soient rares, elles peuvent provoquer des épidémies dramatiques. Le taux de mortalité est compris entre 25% et plus de 80%. Les dernières épidémies ont eu lieu en 1998-2000 en République Démocratique du Congo, en 2005 en Angola et en 2017 en Ouganda. La seule prise en charge possible actuellement est symptomatique car il n'existe pas de traitement contre le virus lui-même. Il n'existe aucun vaccin permettant de protéger la population contre ce virus.

Comme pour la maladie d'Ebola, un vrai contrôle des épidémies est essentiel et pour cela, la vaccination se présente comme la meilleure solution : rapide, efficace et peu coûteuse. Cependant, à l'heure actuelle aucun vaccin n'est disponible. L'objectif de ce projet est donc de développer et de tester un nouveau type de vaccin sûr, simple, rapide et peu cher à produire.

Dans un premier temps, il s'agira de déterminer la dose optimale la plus faible possible de vaccin permettant d'induire une réponse immunitaire suffisante. Dans un second temps, la dose optimale sélectionnée sera testée selon plusieurs schémas de vaccination: soit une seule administration, soit une administration et un rappel.

Les données obtenues dans ce projet pour le développement du vaccin contre le virus Marburg, pourront, à plus long terme, servir de base pour le développement de vaccins vis-à-vis d'autres virus pathogènes de la même famille.

L'utilisation d'un modèle animal est nécessaire pour évaluer la réponse immunitaire induite par le vaccin et pour apporter le maximum d'informations avant la réalisation d'essais cliniques chez l'homme. Les primates non humains (PNH) ont été choisis parce que, d'une part, leur réponse immunitaire à la vaccination est similaire à celle de l'homme et, d'autre part, comme l'homme, ils sont susceptibles à l'infection par le virus Marburg et développent une maladie comparable à la maladie humaine. Ils constituent ainsi le modèle le plus pertinent pour évaluer un vaccin contre le virus Marburg. La preuve de concept et l'innocuité de ce nouveau type de vaccin a déjà été validée chez le PNH pour d'autres maladies infectieuses virales, il n'est donc pas attendu d'effet secondaire majeur dans ce projet.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 60 PNH nés et élevés en captivité dans un établissement reconnu. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Les méthodes expérimentales ont été conçues pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux :

- 1) prélèvements de sang, de fluides muqueux, biopsies et imagerie sous anesthésie générale,
- 2) volumes de sang prélevés réduits au minimum nécessaire pour obtenir des résultats fiables sans affecter le bien-être des animaux,
- 3) hébergement en groupe permettant des interactions sociales en permanence. Les animaux bénéficieront d'enrichissements variés selon le programme d'enrichissement défini par la structure de bien-être animal de l'établissement,
- 4) critères d'arrêt prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets secondaires inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera sollicité afin de mettre en œuvre les traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

12547 L'exposition à des composés organophosphorés (OP) tels que les agents neurotoxiques de guerre (sarin...) ou à certains produits phytosanitaires (pesticides) entraîne l'inhibition irréversible des cholinestérases (enzymes impliquées dans le fonctionnement du système nerveux central) et s'avère donc néfaste aussi bien pour les militaires que pour les civils. Non seulement les intoxications à fortes doses (terrorisme...) sont à considérer, mais aussi celles comportant des expositions uniques ou répétées à des doses asymptomatiques. Les rapports d'intoxication passive, active ou accidentelle aux pesticides (300 000 décès annuels dans le monde pour près de 3 millions de cas d'intoxication reportés) ou lors d'utilisation de gaz neurotoxiques, comme en Syrie récemment, montrent la nécessité de développer des traitements neuroprotecteurs plus efficaces. Sur les 5500 personnes intoxiquées par le sarin lors des attentats de Tokyo de 1995, 6 victimes ont présenté des convulsions, 10% ont développé des désordres neuropathiques et 8% ont souffert de dépression post-traumatique, ce qui montre l'importance des effets à long terme des composés organophosphorés.

Ces composés peuvent induire des crises d'épilepsie, des dommages neurohistologiques ainsi que des phénomènes neuro-inflammatoires. La caractérisation de ces altérations cérébrales (neurotransmission/ neuroinflammation) vise à identifier une cible pertinente pour mettre en place un traitement précoce capable de contrecarrer les effets délétères à long terme de ces molécules sur le cerveau. En effet, la majorité des traitements actuels (atropine + oximes) utilisés lors de la phase aiguë d'intoxication par de fortes doses permettent de réactiver les enzymes cérébrales. Cependant, la prise en charge thérapeutique de sujets exposés à de faibles doses d'OP susceptibles d'engendrer des dysfonctionnements cérébraux sur le long terme n'a pas encore été suffisamment étudiée.

Dans ce contexte, nous proposons de réaliser une approche en imagerie moléculaire in vivo pour :

- 1) Déterminer l'évolution sur le long terme de l'effet d'intoxication par les organophosphorés sur certains mécanismes cérébraux.
- 2) Identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pertinentes et / ou les phases adaptées pour la mise en place d'un traitement neuroprotecteur adéquat.
- 3) Suivre l'effet thérapeutique de différents traitements neuroprotecteurs (ex : anti-inflammatoires) sur les mécanismes cérébraux préalablement caractérisés.

L'imagerie moléculaire par tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle d'exploration non-invasive in vivo de la physiologie et la physiopathologie du système nerveux central et périphérique. Notre laboratoire développe depuis plusieurs années l'imagerie in vivo par TEP sur différents modèles neurologiques en utilisant différents radiotraceurs spécifiques de cibles neurobiologiques qui permettent d'identifier les mécanismes cérébraux (neurotransmission, neuroinflammation) en jeu dans certaines pathologies ou conditions. Trois radiotraceurs seront utilisés dans cette étude longitudinale pour 1) suivre l'effet sur le SNC d'une faible dose unique d'OP, 2) déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques sur le long terme et 3) suivre l'effet thérapeutique de molécules neuroprotectrices.

Les approches in vitro produisent des informations à l'échelle de la cellule sur l'interaction d'une molécule et de sa cible et permettent ainsi de sélectionner /modifier des molécules d'intérêt thérapeutique. Cependant ces approches ne sont pas suffisamment prédictives de l'efficacité et/ou de la toxicité de ces molécules dont le devenir dans l'organisme, et la disponibilité au niveau des tissus cibles sont extrêmement complexes. Le recours à un modèle in vivo est alors indispensable.

L'étude portera sur un modèle d'intoxication par un OP chez la souris déjà utilisé par d'autres équipes, permettant ainsi de se référer à des profils d'intoxication connus. L'objectif est d'évaluer par l'imagerie TEP les effets à long terme de l'intoxication au sarin (neurotoxique de guerre) à faibles doses sur le SNC en utilisant le NIMP, analogue du sarin : (nitrophenyl isopropyl methylphosphonate).

Il n'existe actuellement aucune méthode alternative permettant d'étudier à l'échelle d'un organisme entier la réponse du SNC et périphérique à un neurotoxique à faible dose. Les faibles doses de

neurotoxique utilisées dans cette étude n'engendrent pas de symptômes apparents (crises épileptiques) sur le court terme c'est-à-dire pendant la phase aigüe d'intoxication.

Aux doses prévues de radiotraceurs, aucune toxicité ni aucune souffrance ne sont attendues car l'imagerie TEP, technique est très sensible. Les examens TEP sont réalisés chez des animaux avant et après intoxication par le NIMP dans un premier temps et puis chez des animaux intoxiqués « contrôle » ayant reçu un placebo, et chez des animaux intoxiqués ayant reçu le traitement neuroprotecteur.

Toutes les expérimentations sont réalisées dans le respect de la règle des 3 R. Les différentes étapes de ce projet seront conduites de façon séquentielle afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés, leur souffrance et de s'assurer de leur bien-être tout au long de l'étude. Le bien-être des animaux sera assuré par un hébergement en milieu physiquement et socialement enrichi. Toutes les injections intraveineuses (i.v.) seront réalisées sous anesthésie gazeuse. Les animaux seront surveillés en continu pendant l'intoxication et quotidiennement en post-intoxication. Les variations comportementales, pondérales et d'état seront notées et reportées sur une grille nous permettant d'avoir une indication de souffrance et/ou de détresse de l'animal.

Sur la base des résultats attendus, le nombre de rongeurs, nés et élevés dans des établissements agréés, sera au maximum de 545 souris sur la durée de l'étude, c'est-à-dire 5 ans. Ce nombre d'animaux a été calculé (i) pour démontrer les performances diagnostiques et cinétiques des radiotraceurs d'imagerie et (ii) pour mettre en évidence un effet thérapeutique statistiquement significatif. Les animaux seront habitués à la manipulation avant le début du protocole ce qui permet de diminuer l'état de stress et d'améliorer leur bien-être. Ils seront hébergés en groupe dans une cage enrichie avec des accessoires de jeu et du matériel pour la fabrication de nids.

12548 Les systèmes de production de ruminants sont de plus en plus souvent soumis à des environnements changeants. Pour faire face à ces perturbations, il est nécessaire de sélectionner des animaux résistants et capables de produire lait et/ou viande dans ces environnements.

La robustesse se définit comme la capacité des animaux d'élevage à survivre et à maintenir leurs fonctions de lactation, reproduction et santé dans des environnements changeants. C'est une caractéristique difficile à appréhender car elle est multifactorielle. Une des approches les plus couramment utilisées pour étudier la robustesse des animaux est de les soumettre à des perturbations temporaires et de suivre leurs réponses au cours du temps, en mesurant et analysant leurs paramètres zootechniques, physiologiques, métaboliques, comportementaux, etc... avant, pendant et après la perturbation.

Les objectifs de ce travail sont au nombre de quatre :

- Objectif 1 : Mesurer la variabilité, entre individus, des réponses à des perturbations. La variabilité des réponses sera évaluée au cours, i) de la période de fin de gestation et du début de la lactation (notamment chez la vache laitière pour qui cette période est sensible), ii) d'une perturbation nutritionnelle expérimentale qui interviendra après le pic de lactation à un moment où les vaches ont à nouveau la capacité d'ingérer suffisamment pour couvrir leurs besoins nutritionnels et iii) de perturbations répétées, enchainant trois périodes de déficit alimentaire courts en milieu de lactation.

- Objectif 2 : Analyser et comparer les réponses animales de chaque perturbation entres elles.

- Objectif 3 : Déterminer si l'enchainement de 3 perturbations consécutives induit des effets cumulatifs sur les réponses animales.

- Objectif 4 : Déterminer si la diversité des réponses entre les individus est associée avec des différences d'efficacité d'utilisation des aliments.

Ce travail s'inscrit dans un projet de recherches européen qui a pour objectifs de 1/ Caractériser et quantifier les interrelations entre la robustesse des animaux et la capacité à produire viande et lait, et 2/ Comparer les réponses dans différents environnements de production en utilisant des approches innovantes et de nouvelles mesures.

L'ensemble du projet a été réfléchi en accord avec la règle des 3R :

REDUIRE : Sur la base d'une analyse statistique préalable, un total de 34 vaches adultes de race Charolaise, non-gestantes et en lactation, est prévu pour réaliser ce projet. Il s'agit du nombre minimum afin de garantir une variabilité de réponses animales représentative de la diversité rencontrée en pratique, de mettre en évidence des différences entre les effets temporaux et ainsi permettre d'établir des relations satisfaisantes entre les réponses animales lors des restrictions alimentaires partielles et leur efficacité alimentaire.

RAFFINER : Les vaches seront conduites en lot d'au moins 15 animaux et auront un accès illimité à l'abreuvement ainsi qu'à une zone de repos (logette avec tapis). Elles seront alimentées individuellement ad libitum en dehors des périodes de restrictions alimentaires partielles et à 50 % de leurs besoins lors des périodes de contrainte (ne dépassant pas 10 jours). Les principales sources de stress et de souffrance pour les vaches seront les prélèvements de sang par vénipuncture à la veine caudale et les biopsies de tissu adipeux (réalisés sous anesthésie locale). Au moment de la mise en œuvre de ces prélèvements d'une durée de moins de cinq minutes, les vaches seront bloquées au cornadis et contentionnées (si nécessaire uniquement) par un opérateur entraîné. L'ensemble des autres procédures (pesées, notation d'état, contrôle laitier, échographie) auront un impact limité sur le bien-être des animaux.

REMPLETER : Dans ce projet, il s'agit d'étudier les réponses animales suite à une ou des restrictions alimentaires partielles et les relations éventuelles entre réponses animales et efficacité alimentaire. L'absence de modèle in vitro ou in silico mimant les réponses animales complexes nous contraint à leur utilisation en expérimentation.

12549 L'exposition à des composés organophosphorés (OP) tels que les agents neurotoxiques de guerre (sarin...) ou à certains produits phytosanitaires (pesticides) entraîne l'inhibition irréversible des cholinestérases (enzymes impliquées dans le fonctionnement du système nerveux central) et s'avère donc néfaste aussi bien pour les militaires que pour les civils. Non seulement les intoxications à fortes doses (terrorisme...) sont à considérer, mais aussi celles comportant des expositions uniques ou répétées à des doses asymptomatiques. Les rapports d'intoxication passive, active ou accidentelle aux pesticides (300 000 décès annuels dans le monde pour près de 3 millions de cas d'intoxication reportés) ou lors d'utilisation de gaz neurotoxiques, comme en Syrie récemment, montrent la nécessité de développer des traitements neuroprotecteurs plus efficaces.

Sur les 5500 personnes intoxiquées par le sarin lors des attentats de Tokyo de 1995, 6 victimes ont présenté des convulsions, 10% ont développé des désordres neuropathiques et 8% ont souffert de dépression post-traumatique, ce qui montre l'importance des effets à long terme des composés organophosphorés.

Ces composés peuvent induire des crises d'épilepsie, des dommages neurohistologiques ainsi que des phénomènes neuro-inflammatoires. La caractérisation de ces altérations cérébrales (neurotransmission/ neuroinflammation) vise à identifier une cible pertinente pour mettre en place un traitement précoce capable de contrecarrer les effets délétères à long terme de ces molécules sur le cerveau. En effet, la majorité des traitements actuels (atropine + oximes) utilisés lors de la phase aiguë d'intoxication par de fortes doses permettent de réactiver les enzymes cérébrales. Cependant, la prise en charge thérapeutique de sujets exposés à de faibles doses d'OP susceptibles d'engendrer des dysfonctionnements cérébraux sur le long terme n'a pas encore été suffisamment étudiée.

Dans ce contexte, nous proposons de réaliser une approche en imagerie moléculaire in vivo pour :

- 1) Déterminer l'évolution sur le long terme de l'effet d'intoxication par les organophosphorés sur certains mécanismes cérébraux.
- 2) Identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pertinentes et / ou les phases adaptées pour la mise en place d'un traitement neuroprotecteur adéquat.
- 3) Suivre l'effet thérapeutique de différents traitements neuroprotecteurs (ex : anti-inflammatoires) sur les mécanismes cérébraux préalablement caractérisés.

L'imagerie moléculaire par tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle d'exploration non-invasive in vivo de la physiologie et la physiopathologie

du système nerveux central et périphérique. Notre laboratoire développe depuis plusieurs années l'imagerie in vivo par TEP sur différents modèles neurologiques en utilisant différents radiotraceurs spécifiques de cibles neurobiologiques qui permettent d'identifier les mécanismes cérébraux (neurotransmission, neuroinflammation) en jeu dans certaines pathologies ou conditions. Trois radiotraceurs seront utilisés dans cette étude longitudinale pour 1) suivre l'effet sur le SNC d'une faible dose unique d'OP, 2) déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques sur le long terme et 3) suivre l'effet thérapeutique de molécules neuroprotectrices.

Les approches in vitro produisent des informations à l'échelle de la cellule sur l'interaction d'une molécule et de sa cible et permettent ainsi de sélectionner /modifier des molécules d'intérêt thérapeutique. Cependant ces approches ne sont pas suffisamment prédictives de l'efficacité et/ou de la toxicité de ces molécules dont le devenir dans l'organisme, et la disponibilité au niveau des tissus cibles sont extrêmement complexes. Le recours à un modèle in vivo est alors indispensable. L'étude portera sur un modèle d'intoxication par un OP chez la souris déjà utilisé par d'autres équipes, permettant ainsi de se référer à des profils d'intoxication connus. L'objectif est d'évaluer par l'imagerie TEP les effets à long terme de l'intoxication au sarin (neurotoxique de guerre) à faibles doses sur le SNC en utilisant le NIMP, analogue du sarin : (nitrophenyl isopropyl methylphosphonate).

Il n'existe actuellement aucune méthode alternative permettant d'étudier à l'échelle d'un organisme entier la réponse du SNC et périphérique à un neurotoxique à faible dose. Les faibles doses de neurotoxique utilisées dans cette étude n'engendrent pas de symptômes apparents (crises épileptiques) sur le court terme c'est-à-dire pendant la phase aigüe d'intoxication.

Aux doses prévues de radiotraceurs, aucune toxicité ni aucune souffrance ne sont attendues car l'imagerie TEP, technique est très sensible. Les examens TEP sont réalisés chez des animaux avant et après intoxication par le NIMP dans un premier temps et puis chez des animaux intoxiqués « contrôle » ayant reçu un placebo, et chez des animaux intoxiqués ayant reçu le traitement neuroprotecteur.

Toutes les expérimentations sont réalisées dans le respect de la règle des 3 R. Les différentes étapes de ce projet seront conduites de façon séquentielle afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés, leur souffrance et de s'assurer de leur bien-être tout au long de l'étude. Le bien-être des animaux sera assuré par un hébergement en milieu physiquement et socialement enrichi. Toutes les injections intraveineuses (i.v.) seront réalisées sous anesthésie gazeuse. Les animaux seront surveillés en continu pendant l'intoxication et quotidiennement en post-intoxication. Les variations comportementales, pondérales et d'état seront notées et reportées sur une grille nous permettant d'avoir une indication de souffrance et/ou de détresse de l'animal.

Sur la base des résultats attendus, le nombre de rongeurs, nés et élevés dans des établissements agréés, sera au maximum de 545 souris sur la durée de l'étude, c'est-à-dire 5 ans. Ce nombre d'animaux a été calculé (i) pour démontrer les performances diagnostiques et cinétiques des radiotraceurs d'imagerie et (ii) pour mettre en évidence un effet thérapeutique statistiquement significatif. Les animaux seront habitués à la manipulation avant le début du protocole ce qui permet de diminuer l'état de stress et d'améliorer leur bien-être. Ils seront hébergés en groupe dans une cage enrichie avec des accessoires de jeu et du matériel pour la fabrication de nids.

12550 Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier la stabilité et le devenir d'une molécule, candidat-médicament, dans le tractus gastro-intestinal après administration par voie orale chez le primate. Le devenir de cette molécule et le potentiel immunogénique peuvent être étudiés dans différents tissus ou liquides biologiques. Dans le cadre de ce projet, un suivi de la molécule dans les selles sera réalisé.

Pour suivre l'élimination de la molécule étudiée dans les selles au cours du temps et les propriétés immunogéniques, un recueil de selles sera réalisé chez le primate vigile pendant une ou plusieurs périodes après l'administration du candidat-médicament.

Ces recueils seront ensuite traités et analysés pour mesurer la stabilité, la diffusion et l'élimination du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et la production d'anticorps.

Plusieurs administrations pourront être effectuées sur un même animal en respectant une durée minimale de 72 heures de récupération entre 2 administrations, ce qui permet de raffiner l'expérience.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 135 primates sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le primate non humain car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur (à adapter au modèle). Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le primate non humain est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures les moins invasives possibles (endoscopie)
- le suivi d'éventuels signes cliniques
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

12551 Sous des latitudes tempérées, les ovins, comme de nombreuses espèces d'ongulés connaissent une reproduction saisonnière. Ainsi, on observe une saison sexuelle à laquelle fait suite une saison de repos sexuel ou anoestrus durant laquelle il n'y a pas de cycle ovulatoire. Durant cette période de repos, il est donc impossible de mettre les femelles à la reproduction sans utiliser de traitements hormonaux exogènes qui sont remis en question pour leur impact environnemental et sociétal et pour leurs conséquences sur l'animal lui-même. Dans ce cadre, "l'effet mâle" qui est observé après l'introduction d'un mâle auprès d'un groupe de femelle en anoestrus conduit à l'obtention d'une ovulation qui peut être fertile en saison de repos sexuel.

Parmi les nombreuses stimulations somatosensorielles provenant du mâle, il est bien connu que les stimulations olfactives sont les plus efficaces pour induire l'ovulation. Dans ce cadre, le projet se propose d'identifier les odeurs émises par le mâle et de voir dans quelles mesures elles permettent de réaliser un effet mâle chez la femelle. A cette fin, nous commencerons par identifier les odeurs sécrétées par le mâle en saison de reproduction. Ainsi, cette expérience utilisera 20 béliers dont 5 seront castrés et 8 brebis sur lesquels seront prélevés, en saison de reproduction et hors de la saison de reproduction, des échantillons de laine à des fins d'analyse chimique (identification de composés olfactifs).

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

- remplacement : aucune méthode ne permet à l'heure actuelle d'étudier la production de composés olfactifs spécifiques par des méthodes substitutives à l'emploi d'animaux comme des méthodes in vitro ou de modélisation.
- réduction : le nombre d'animaux a été réduit au maximum compte tenu des techniques utilisées et de la faible variabilité dans les profils olfactifs probablement induits par la castration (n=5 animaux castrés, seuls concernés par cette saisine).
- raffinement : les animaux seront hébergés en groupes sociaux sur paille dans des conditions classiques de bergerie. Aucune intervention invasive n'est prévue hors de la castration. Celle-ci est réalisée dans les conditions vétérinaires les plus strictes avec administration de composés

anesthésiques, anti-inflammatoires et analgésiques. Le prélèvement de laine est moins stressant que la tonte complète réalisée périodiquement en conditions d'élevage.

12552 Chez la souris, l'olfaction joue un rôle prépondérant dans l'expression de différents comportements sociaux, notamment reproducteurs. Nombre de ces comportements et réponses physiologiques sont dépendantes d'un organe spécialisé dans la détection de ces odeurs: l'organe voméronasal. Au niveau cellulaire, cet organe est constitué d'un épithélium olfactif impliqué dans la détection des odeurs, qui est constitué de deux couches. Une couche basale où les cellules utilisent une voie de signalisation médiée par la protéine Gao et une couche apicale où les cellules utilisent Gai2. Après avoir réalisé différents travaux sur l'implication des cellules utilisant Gao nous désirons maintenant étudier la population exprimant Gai2.

A cette fin, nous avons généré un mutant conditionnel où l'expression de Gai2 est mutée au spécifiquement au sein de cette population olfactive de l'organe voméronasal. Nous étudierons les conséquences de cette mutation sur une vaste gamme de comportements et de réponses physiologiques associées et comprenant: les préférences olfactives sexuelles, le comportement sexuel mâle et femelle, l'agression inter-mâles et l'agression maternelle, le comportement maternel, la modulation de la fonction de reproduction suite à l'exposition aux odeurs de sexe opposé.

Ce projet utilisera 328 souris mâles et femelles.

Nous avons vérifié l'adéquation de notre protocole avec la règle des 3R :

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

- réduction : le nombre d'animaux a été réduit au maximum compte tenu des techniques utilisées. Par ailleurs, un calcul de puissance a été effectué afin de montrer que les effectifs utilisés permettent d'atteindre une bonne mise en évidence statistique.

- raffinement : les animaux seront hébergés en groupes sociaux sur litière et avec un enrichissement (présence d'un abri cartonné dans la cage, enrichissement acoustique). Lors des procédures chirurgicales, les animaux seront anesthésiés et recevront un traitement analgésique adapté. Les tests comportementaux pouvant présenter des risques pour les animaux (test d'agression) seront limités en durée et arrêtés au-delà d'un seuil d'agression défini.

12553 La toux est un moyen de défense efficace et immédiat qui permet de protéger les poumons et les voies aériennes contre l'inhalation de substances irritantes. En coordination avec le système bronchique, ce réflexe permet également d'éliminer les sécrétions produites par l'appareil respiratoire. Le réflexe de toux est déclenché par la stimulation mécanique ou chimique des voies nerveuses qui cheminent dans le nerf vague. Ces fibres transmettent les messages à un réseau complexe de neurones situés au niveau du tronc cérébral où ils sont intégrés, transformés en une réponse motrice complexe qui conditionne la toux. Toute altération dans le déclenchement, la transmission ou l'intégration de ces signaux nerveux peut aboutir à la suppression ou au contraire à l'exagération de ce réflexe. Le modèle du lapin adulte de type Néo-zélandais a été choisi car c'est une espèce animale qui présente un réflexe de toux contrairement à d'autres espèces (rongeurs : souris ou rat). De plus, l'étude de ce réflexe nécessite l'utilisation d'un modèle physiologique intégré qui ne peut pas être remplacé par des méthodes alternatives (Remplacement). L'étude est réalisée sous anesthésie générale d'une durée d'environ 120 - 180 min et sans le réveil de l'animal (Raffinement). Le choix de l'anesthésie et analgésie est limité par la spécificité de notre protocole. L'utilisation d'une anesthésie volatile n'est pas possible car la trachée est utilisée pour les mesures de la ventilation et la provocation de la toux. L'utilisation des barbituriques de longue durée est impossible du fait de l'activité dépressive sur les centres du réflexe de toux. Le choix d'analgésie est limité car les différentes classes médicamenteuses possibles présentent des incompatibilités avec nos investigations envisagées (Les morphiniques sont des supprimeurs de la toux et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) constitueraient une interférence avec l'étude des mécanismes de la toux lors d'une inflammation). L'action myorelaxante des nombreuses

substances anesthésiques et analgésiques n'est pas souhaitée, car les myorelaxants suppriment la réponse motrice du réflexe de toux. Depuis plusieurs années, nous avons utilisé un protocole anesthésie - analgésie validé par un projet similaire à celui-ci, pour être en conformité avec la réglementation en vigueur tout en préservant le réflexe de toux. Aujourd'hui l'arrêt de la commercialisation de l'anesthésique choisi pour le projet précédent nous oblige à redéfinir un protocole d'anesthésie et d'analgésie qui respecte l'absence de douleur, l'atteinte d'une anesthésie chirurgicale et la préservation d'un réflexe de toux induit mécaniquement et chimiquement. L'analyse bibliographique nous a permis de définir 4 protocoles possibles. Le principe général repose sur la combinaison de plusieurs médicaments pour réduire les doses respectives de chacun et ainsi diminuer les effets secondaires connus notamment vis-à-vis de l'inhibition de la toux. Dans la mesure du possible nous allons prioriser un protocole incluant les trois phases de l'anesthésie que sont la prémédication, l'induction et l'entretien pour assurer le bien-être animal (Raffinement) et le confort pour les opérateurs. Lorsque l'anesthésie chirurgicale est atteinte les animaux seront trachéotomisés, les réponses de toux à la stimulation mécanique et à la stimulation chimique seront testées selon un ordre aléatoire. A l'issue des 180 min d'expérimentation au total, les animaux sont euthanasiés. Nous allons ainsi tester 4 protocoles « anesthésie-analgésie » ce qui nécessitera de 8 à 17 lapins maximum. Afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés pour le projet, le premier protocole testé est celui présentant la plus forte valence analgésique et anesthésique tout en étant le plus susceptible de préserver le réflexe de toux. Si les 3 premiers animaux de ce protocole donnent les résultats escomptés en termes de réponses de toux, 5 animaux supplémentaires seront utilisés pour confirmer et consolider l'étude. Par contre, si les 3 premiers animaux de ce protocole ne donnent pas les résultats escomptés en termes de réponses de toux, l'expérimentation avec ce protocole sera suspendue et le protocole 2 sera alors testé. La même démarche sera suivie pour le passage au protocole 3 voire 4 en cas d'échec du protocole précédemment testé. Cette démarche permet de limiter le nombre d'animaux à 8 en cas de validation du premier protocole au lieu des 17 qui seront nécessaires si nous sommes amenés à tester les 4 protocoles (Réduction). La première phase d'expérimentation (8 animaux) sera réalisée en utilisant des animaux issus d'un projet pédagogique de gravité légère (Réduction). Les animaux seront hébergés minimum 7 jours après la fin du projet pédagogique et avant leur inclusion dans ce projet (Raffinement). Pendant la période de stabulation (Hébergement par 8 en box de 30000 cm² au sol nourris ad libitum et environnement enrichi de tunnels), ils seront surveillés chaque jour (Raffinement). Dans l'éventualité, bien que peu probable, de la survenue de signes de souffrance, de détresse ou d'inconfort réel (diminution ou arrêt de consommation alimentaire ou de boisson sur 48 heures, perte de poids de plus de 10% en 3 jours, prostration, difficulté de déplacement, gênes respiratoires), les mesures mise en place seraient l'arrêt des expériences, isolement, surveillance accentuée. L'animal serait mis à mort en cas de persistance dans les 72 heures ou en cas d'aggravation brutale. Au cours des différentes anesthésies une surveillance accrue, tous les 10 mins, sera réalisée concernant les signes suivants : Signes de détresse respiratoire (diminution de la fréquence respiratoire de plus de 75% par rapport à l'état basal associé à des signes d'expiration forcée), coloration bleutée des muqueuses, diminution du rythme cardiaque majeure. En cas de survenue de tels signes et persistance de plus de 5 min, l'animal serait mis à mort.

12554 La borréliose de Lyme (LB) est la maladie à transmission vectorielle la plus répandue en Europe. Elle est causée par des spirochètes appartenant au complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl). La LB peut toucher un large éventail de tissus, notamment la peau, le système nerveux, les articulations, le cœur et, moins fréquemment, d'autres organes.

Les bactéries sont transmises par une morsure de tique dure du genre *Ixodes*. Les tiques peuvent parasiter un grand nombre d'hôtes (petits et grands mammifères, oiseaux reptiles).

Bien que le traitement avec des antibiotiques appropriés peu de temps après le début de l'infection guérisse généralement l'infection, une longue durée de traitement peut être nécessaire si l'infection devient chronique. La maladie chronique est, en partie, une conséquence malheureuse de l'ambiguïté entourant le diagnostic de la borréliose de Lyme. Plusieurs manifestations neurologiques rares ont également été associées à l'infection par *B. burgdorferi* s.l.

La pathogénèse de la maladie de Lyme dépend des caractéristiques génétiques de la bactérie, de la capacité de l'hôte à contrôler l'infection et également des facteurs apportés par la tique.

L'infection a été établie chez divers animaux de laboratoire, notamment les rats, les souris, les hamsters, les cobayes, les gerbilles et les lapins. Des données précieuses sur la manière dont l'infection s'établit ont été obtenues à partir d'études sur ces petits animaux. Malheureusement, aucun de ces modèles ne reproduit le large éventail de manifestations cliniques observées chez l'homme.

Il a été démontré que la génétique de l'hôte influence la sensibilité des souris à l'arthrite induite par *Borrelia*. Étant donné que les modèles murins actuels d'infection à *Borrelia* n'ont été étudiés que sur un très petit nombre de lignées de laboratoire de souris, l'infection de lignées de souris génétiquement différentes conduirait probablement à de grandes variations de la symptomatologie. Notre objectif est d'obtenir de nouveaux modèles murins d'infection à *Borrelia* capables de reproduire toute la gamme des symptômes humains de la borréliose de Lyme. Nous tirerons parti de la diversité génétique d'une collection de lignées murines dont la variation génétique correspond à celle de populations humaines. Ces nouveaux modèles de borréliose humaine sévère contribueront à mieux comprendre les mécanismes pathologiques et à tester l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans une première procédure qui impliquera 1104 souris, 16 lignées murines seront soumises à une évaluation simple mais discriminante de leur sensibilité après injection par voie sous-cutanée de 3 espèces de *Borrelia burgdorferi* européennes isolées à partir d'échantillons humains en absence et en présence de salive de tiques. Dans un deuxième temps, 5 lignées présélectionnées seront soumises à une caractérisation plus complète (plusieurs points dans le temps, plusieurs échantillons et paramètres) toujours après injection sous-cutanée d'une souche de *Borrelia burgdorferi* sl (choisie en fonction des résultats de la première expérience). Dans une deuxième procédure qui impliquera 408 souris, nous testerons également la réponse des souris à une infection naturelle par des tiques infectées par une souche de la bactérie *Borrelia*. Dans une troisième procédure qui impliquera 648 souris, nous testerons l'effet d'antibiotiques utilisés couramment dans le cadre du traitement de la borréliose de Lyme chez l'homme ainsi qu'une combinaison de molécules ayant un effet sur les formes persistantes de la bactérie. Les symptômes attendus consistent en des arthrites des chevilles qui ont généralement peu de répercussion sur la mobilité. Les symptômes neurologiques peuvent être plus invalidants (paresthésie, paralysies, douleurs) et justifient un classement en modéré des 3 procédures que nous allons mettre en oeuvre (nombre de souris : 2160).

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

Les études réalisées *in vitro* ne peuvent pas rendre compte de la complexité des symptômes observés chez l'homme ni même de la possibilité d'un passage à la chronicité de certains de ces symptômes, notamment les symptômes neurologiques. L'infection par *Borrelia* n'est pas mortelle chez l'homme ni chez les lignées de souris testées jusqu'à présent. La mise en place de points limites basés sur l'apparition de symptômes neurologiques nous permettra d'euthanasier les souris avant l'apparition d'une souffrance importante ou chronique. Les résultats obtenus dans la procédure 1 seront analysés, et une étude statistique sera effectuée, afin d'adapter au plus juste le nombre et la taille des groupes expérimentaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs pour les autres procédures.

Des procédures de raffinement seront utilisées afin de garantir le confort des animaux. Il est prévu de suivre l'état de santé des souris de façon quotidienne, ce qui permettra de détecter précocement tout signe de souffrance et l'atteinte éventuelle des points limites. De la nourriture semi-liquide sera mise à disposition des souris dès lors qu'une gêne même légère à la motricité sera observée.

12555 Le développement d'un modèle animal pertinent et prévisible de la maladie de Parkinson (MP) est un besoin non satisfait pour la communauté de recherche afin de mieux comprendre les mécanismes de la pathologie et pour l'identification et la validation de stratégies thérapeutiques. À ce jour, les modèles de souris transgéniques où les gènes pathogéniques sont surexprimés dès les

premiers stades de développement ont échoué à reproduire les caractéristiques cardinales de la MP et à produire des modèles symptomatiques robustes et prédictifs. Ce projet a pour but d'effectuer une caractérisation / validation longitudinale complète des symptômes et de la neuropathologie associée dans un nouveau modèle animal de MP basé sur l'inactivation d'un gène lysosomal associé à la MP chez le rat. Non seulement cette approche sera utile pour modéliser la MP, mais sa nature polyvalente permettra le développement de modèles imitant d'autres troubles neurodégénératifs dévastateurs qui partagent des caractéristiques communes avec les maladies de surcharge lysosomale. Ce nouveau modèle animal qui sera caractérisé en profondeur offrira de nouvelles perspectives dans la pathogenèse de la MP et sera un outil puissant pour tester et valider des approches thérapeutiques. Pour chaque état et à chaque génération nous assurerons un suivi rigoureux des animaux afin de garantir que le modèle dispose des caractéristiques propres au développement de la MP mais que le développement de ces événements n'est pas néfaste au bien-être animal. Dans le cas contraire, nous mettrons en œuvre l'ensemble des soins et limiterons la souffrance et le mal être à leur minimum en établissant des points limites stricts.

Ce projet utilisera 168 rats et sera réalisé en application de la règle des 3R: Remplacer: Ces approches analysant le comportement de l'animal, il n'est pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier. Réduire: (i) nous avons rédigé un protocole expérimental rigoureux permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux en planifiant uniquement des expériences qui nous semblent absolument nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques. (ii) nous effectuerons des mesures répétées et un suivi longitudinal des animaux. (iii) Nous mettrons en place des tests statistiques performants : ANOVA multi factorielle suivi de tests "post-hoc" de comparaison de moyennes de deux échantillons avec ajustement de l'erreur. Raffiner: nous avons planifié nos expériences en apportant une attention particulière pour supprimer la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux en utilisant des molécules et des points limites adaptés ainsi que des tests comportementaux qui requièrent peu ou pas d'intervention directe de l'expérimentateur.

12556 La leptine est une hormone sécrétée par le tissu adipeux dont la fonction principale chez l'adulte est de contrôler la prise alimentaire et le métabolisme énergétique. Cependant cette fonction anorexigène n'est pas présente chez les nouveau-nés. De nombreuses études montrent que la leptine a une fonction neurotrophique aux stades précoces du développement. En effet, des taux optimaux de leptine sont nécessaires pour un développement correct du cerveau. Il a été montré sur des modèles animaux, qu'un déficit de leptine ou au contraire un excès de leptine, en modifiant le développement cérébral, favoriseraient l'émergence de différents troubles métaboliques (obésité, diabète) mais également neuronaux tels que les troubles du spectre autistique.

Le syndrome de Rett est une maladie d'origine génétique, liée au chromosome X, qui altère le développement du système nerveux central et se manifeste par l'apparition de troubles moteurs et intellectuels graves. Il n'existe aucun traitement contre cette maladie. Des études cliniques montrent que les patients souffrant de troubles autistiques ou du Syndrome de Rett présentent des taux anormalement élevés de leptine dans le sang. Les mêmes observations ont été faites sur des modèles animaux de ces pathologies.

Nous souhaitons analyser et comprendre le rôle de la leptine dans la pathogenèse du Syndrome de Rett.

Pour ce projet nous utiliserons un modèle murin du syndrome de Rett : les souris génétiquement modifiées pour inactiver le gène *Mecp2* (*Mecp2*-null). Ces souris récapitulent les symptômes et troubles décrits chez les patients, et ont donc un phénotype dommageable. En effet, ces souris présentent des difficultés respiratoires sévères, des problèmes de locomotion, ainsi qu'une perte de poids (à partir de 30 jours postnatal (P30) pour les mâles et P180 pour les femelles).

Nous utiliserons 596 animaux. Ce projet a été planifié pour appliquer au mieux la règle des 3R, c'est-à-dire la réduction et le raffinement permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Concernant le remplacement, les études que nous proposons se focalisent sur l'organisation des réseaux neuronaux, lesquelles ne peuvent être reproduites dans des modèles de cultures neuronales ou lignées cellulaires in vitro. De plus, les souris transgéniques permettent de réaliser des expériences sur des modèles de maladies comme les troubles du spectre autistique. Pour

réduire le nombre d'animaux utilisés, lorsque cela sera possible, chaque animal servira à plusieurs évaluations comportementales et/ou électrophysiologiques ou biochimiques ou histologiques. Pour optimiser et réduire le nombre d'animaux, trois chercheurs seront mobilisés pour les sessions d'enregistrements électrophysiologiques. Pour les analyses biochimiques et histologiques plusieurs protéines et/ou ARN seront étudiés par animal.

Nous envisageons d'appliquer plusieurs protocoles par expérience afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Nos études précédentes montrent que pour atteindre une puissance statistique conséquente, des groupes de 3 à 13 animaux sont nécessaires. Il convient d'utiliser des groupes de 13 animaux pour les expériences de comportement, de 7 animaux pour les expériences d'électrophysiologie, de 3 animaux pour les expériences de biochimie et d'histologie.

Pour les expériences de comportements, les animaux seront habitués à la salle d'expérimentation dans leur propre cage et à la manipulation par l'expérimentateur.

Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement via la mesure de leurs poids et l'observation de leur aspect physique et comportement. Les animaux seront hébergés en groupe social adéquate. Les cages seront enrichies en tunnels ou dome-home et en matériaux de nidification.

12557 Le cancer de la prostate est l'un des cancers les plus fréquemment diagnostiqués chez l'homme dans les pays industrialisés. Il représente actuellement la troisième cause de mortalité par cancer en Europe. Le développement de cette pathologie étant fortement lié à l'âge, le vieillissement actuel de la popula

tion va favoriser sa prévalence dans les années à venir. Une caractéristique de ce cancer est son développement qui est dépendant des androgènes. Ainsi, en complément à la chirurgie, on retrouve, parmi les approches thérapeutiques, la suppression de la stimulation androgénique des cellules tumorales. Cependant, cette castration chimique va conduire à un échappement thérapeutique et à l'apparition d'un cancer dit androgéno-indépendant pour lequel il n'existe pas de traitement curatif à l'heure actuelle. Il y a donc un réel besoin clinique de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'évolution de ce cancer, afin de proposer de nouveaux marqueurs pronostics et diagnostiques, ainsi que des stratégies thérapeutiques efficaces pour les stades tardifs du cancer de la prostate. Depuis la découverte des canaux calciques, un grand nombre de laboratoires ont mis en évidence leur implication dans la régulation de l'homéostasie calcique cellulaire. L'implication des perturbations de cette dernière dans les mécanismes de cancérisation et d'évolution des cancers a été suggérée par de nombreuses équipes. Ces perturbations résulteraient de variations quantitatives et fonctionnelles affectant ces canaux ou les protéines modulant leur activité. Ces canaux et leurs partenaires, de par leur localisation membranaire, constitueraient donc des cibles thérapeutiques potentielles car ils sont relativement faciles d'accès pour les molécules pharmacologiques. Le but de notre projet est double :

- mettre en évidence dans les cellules souches cancéreuses (CSCs) la nature et le rôle des canaux calciques que nous avons identifiés comme critiques dans la cancérogénèse prostatique. Ces canaux pourraient à terme servir de marqueur ou de cible thérapeutique pour cette sous-population tumorale qui constituerait l'origine de la résistance des cancers aux chimiothérapies ainsi qu'un réservoir cellulaire conduisant à la récurrence. Pour cela, nous allons utiliser 3 modèles distincts : les cancers de la prostate et du pancréas sur lesquels notre laboratoire travaille depuis plusieurs années, ainsi que le mélanome malin, un autre cancer dont les CSCs sont déjà partiellement caractérisées. L'utilisation de ces 3 modèles nous permettra de vérifier l'existence de mécanismes ioniques communs. Pour ce projet, nous utiliserons des séries de 5 souris par condition (3 lignées cancéreuses, 3 quantités de cellules). 90 souris au total seront donc utilisées.

- mettre en évidence dans le cancer de la prostate le rôle du récepteur Sigma 1 (S1R) et de ses ligands. Nous allons tout particulièrement nous intéresser à son rôle potentiel de protéine partenaire des canaux calciques que nous avons préalablement identifiés comme étant cruciaux dans la cancérogénèse. Il pourrait en effet s'agir d'une cible thérapeutique unique permettant de cibler plusieurs acteurs cruciaux du cancer, augmentant ainsi potentiellement l'efficacité de futurs

traitements innovants. Pour ce projet, nous utiliserons des séries de 5 souris par condition (2 lignées cancéreuses prostatiques, 1 quantité de cellules 1 stratégie de modulation d'expression de la cible S1R : SiRNA). 30 souris au total seront donc utilisées.

Règles des 3R

R de réduire : Afin de minimiser au maximum le nombre de souris dans cette étude, nos cibles d'intérêt seront identifiées et caractérisées in vitro. R de remplacer : l'efficacité des traitements effectués dans le cadre de cette étude sera évaluée in vitro avant de réaliser les expériences chez l'animal, étape indispensable pour valider nos hypothèses. Pour la partie de notre projet portant sur les cellules souches cancéreuses, les expériences prévues chez l'animal sont les seules à même de confirmer le caractère souche de nos cellules. R de raffiner : Toutes les mesures seront mises en place afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux (nombre limité de souris par cage, les injections réalisées par du personnel expérimenté afin d'assurer un geste rapide et indolore, enrichissement de la cage (cotons qui serviront de jeux ludiques)

Grâce à ces résultats, nous espérons apporter de nouvelles connaissances cibles thérapeutiques potentielles.

12558 L'utilisation d'hormones de synthèse, pour la conduite des élevages a des impacts négatifs connus sur l'environnement. L'élevage porcin conventionnel est conduit en bandes successives d'animaux, généralement espacées de 3 semaines, dans lesquelles toutes les femelles sont inséminées, mettent bas et sont sevrées le même jour. Pour y parvenir, les éleveurs réalisent une synchronisation des cycles de leurs femelles reproductrices, en distribuant dans l'alimentation pendant 18 jours un analogue de progestérone (progestagène de synthèse). Cinq jours après l'arrêt de la distribution, les femelles viennent spontanément en chaleur et sont donc inséminées dans la même période.

Cette pratique présente un intérêt certain pour organiser le travail mais aussi pour constituer des lots homogènes de porcelets (même âge, même poids).

Le cahier des charges pour l'élevage biologique interdit d'avoir recours aux hormones de synthèse. La synchronisation des cycles avec un progestagène de synthèse n'est donc pas possible dans ce système de production sans qu'il n'existe de réelles alternatives.

Des travaux récents montrent que des composants dits "phytoprogestagènes" présents dans certaines plantes peuvent influencer la durée du cycle sexuel chez la ratte et certains primates.

Nous souhaitons tester l'effet de ces "substituts naturels" en élevage porcin et remplacer la distribution des hormones de synthèse par la distribution directe dans l'alimentation de plantes contenant de forts niveaux de phytoprogestagènes, une légumineuse et un tubercule.

Nous utiliserons 36 animaux répartis en 5 lots expérimentaux de 6 cochettes soit 30 femelles pubères

- un lot témoin qui ne recevra aucune supplémentation
- un lot témoin "positif" qui recevra la progestérone de synthèse
- un lot supplémenté avec la légumineuse
- un lot supplémenté avec le tubercule
- un lot supplémenté avec les 2 plantes pour vérifier l'effet cumulatif

Nous mesurerons :

- les consommations moyennes (mesure des quantités allouées et refusées)
- l'intervalle entre deux chaleurs par détections quotidiennes des chaleurs au verrat
- la progestérone sanguine 15 et 20 jours après la première chaleur, l'œstradiol et la progestérone salivaire tous les 5 jours, ces marqueurs permettant d'évaluer le stade du cycle.

Pour le dosage de progestérone sanguine, pour chaque femelle, 2 prises de sang seront réalisées à la veine jugulaire après contention de l'animal.

La règle des 3R a été prise en considération :

- Remplacer : l'utilisation de l'animal est nécessaire pour documenter les réponses hormonales et comportementales
- Réduire : un calcul du nombre d'animaux nécessaires a été réalisé afin d'estimer au plus juste le nombre d'individus à inclure dans le projet.
- Raffiner : Le nombre et la fréquence des prises de sang pour le suivi hormonal a été réduit au minimum. Par ailleurs, des collectes de salive, non invasives et non stressantes (simple présentation d'un coton à mâchouiller) seront réalisés, afin de mettre au point des dosages hormonaux dans la salive qui remplaceront à terme les dosages sanguins. Les conditions d'hébergement sont raffinées par la mise à disposition de ballons, permettant l'activité et le comportement exploratoire et les relations sociales ; les animaux sont manipulés dans le calme par des animaliers expérimentés et habitués à être en contact avec les animaux utilisés ; les prises de sang sont réalisées par ce même personnel formé pour réaliser ces prélèvements sanguins en moins d'une minute entre la contention, le prélèvement sanguin, la désinfection et la libération de l'animal.

12559 La cécité est un problème de santé publique qui handicape gravement les personnes atteintes et qui concerne un français sur 1000. Il est donc nécessaire de développer des modèles expérimentaux pertinents de dégénérescence rétinienne pour pouvoir ensuite tester l'efficacité de stratégies thérapeutiques applicables chez l'homme nous devons recourir à des modèles animaux. Nous proposons donc de développer un modèle animal préclinique ayant un phénotype de dégénérescence rétinienne.

Il existe un nombre très important de mutations responsables de dégénérescence rétinienne héréditaire, la Rétinite Pigmentaire étant la maladie génétique la plus hétérogène qui soit. Le problème de la diversité des gènes mutés, la diversité des mutations de ces gènes mais aussi des autres formes de la pathologie incite à aborder un modèle préclinique mimant le mécanisme commun aux différentes formes de dégénérescences, en aval des mutations. Par exemple, toutes ces atteintes partagent la même voie terminale : l'activation du programme de mort cellulaire qui conduit à la perte des photorécepteurs. Nous proposons donc de créer un modèle 'général' de Rétinopathie Pigmentaire basé sur ce phénotype commun de perte de photorécepteurs. Pour ce faire, il est possible d'administrer une protéine phototoxique inductible au sein de cellules cibles de la rétine. L'illumination de cette protéine à une longueur d'onde spécifique conduira à l'invalidation des cellules dans lesquelles elle est exprimée. Cela permettra alors de mimer le dysfonctionnement de ces cellules dans la rétine d'animaux initialement sains et donc d'étudier la dégénérescence cellulaire et ses conséquences sur l'environnement rétinien. Ce modèle a pour avantage de récapituler le phénotype commun à l'ensemble des Rétinopathies Pigmentaires.

Pour ce projet on utilisera des primates non-humains, seule espèce ayant des propriétés anatomiques similaires à l'homme au niveau de l'œil, notamment de la rétine. Ce projet s'appuie sur des études préalables in vitro et chez le rongeur.

R de remplacer : Aucun système in vitro ne peut mimer une dégénérescence rétinienne et nous informer sur un effet de population de neurones dans la rétine,

R de réduire : Le nombre d'animaux (20) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives. Chaque animal est utilisé pour l'ensemble des étapes du projet, de l'injection intraoculaire au prélèvement des tissus d'intérêt pour l'analyse. La mise en œuvre d'un suivi longitudinal non invasif (imagerie in vivo sur les animaux anesthésiés) minimise le nombre d'animaux utilisés ainsi que la contrainte qui leur est imposée.

R de raffiner : Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Les actes chirurgicaux réalisés entraînant une douleur modérée, une observation régulière des animaux sera faite pour détecter tout signe de détresse, et si cela est jugé nécessaire, la douleur postopératoire sera gérée par l'administration d'analgésiques. Les animaux seront hébergés en groupe, dans des conditions enrichies en favorisant les interactions sociales.

12560 La contamination du site opératoire représente actuellement la principale cause de survenue d'infection en présence de matériel étranger (prothèses) en chirurgie vasculaire, qui méritent une attention particulière. Un traitement antibiotique empirique dans ce cas est prohibé. Cependant, le taux de réinfection des nouvelles prothèses, même imprégnées d'antiseptiques ou d'antibiotiques, reste significativement élevé.

Cette étude va examiner l'efficacité anti-infectieux d'une prothèse vasculaire dotée d'un nouveau mécanisme de libération prolongée d'antibiotiques pour prévenir les infections en milieu opératoire déjà contaminé un modèle animal.

L'objectif est de tester l'activité de différents substituts vasculaire activé par différentes molécules antimicrobiennes chez la souris C3H/He dans des poches sous-cutanée infectées par des germes bactériens couramment rencontrés dans ce type d'infection. Donc il consiste à créer une poche sous cutanée, et mettre une dose de bactéries pour provoquer l'infection et simuler le milieu opératoire déjà contaminé, ensuite implanter un morceau de prothèse antibactérienne dedans, puis le fermer par suture. Ces prothèses seront prélevées au bout de 7 jours, permettant une étude microbiologique des implants, ainsi qu'une observation macroscopique de la poche. Nombre total d'animaux pour ce projet sera 81 souris.

Tous les efforts ont été faits pour le respect de la règle des 3R.

Remplacer : Bien que les résultats obtenus par les tests in vitro nous aient montré un effet très prometteur, ils peuvent pas remplacer des données in vivo, ils nous permettent de ne sélectionner que le meilleur matériel pour l'étude sur les animaux, donc éviter ou réduire l'utilisation des animaux.

Réduire : En référence aux publications antérieures, un minimum de 9 animaux par groupe sera suffisant pour montrer avec une puissance statistique suffisante ($\alpha=80\%$, $p=0.05$). Des études précédentes ont démontré les procédures expérimentales, avec laquelle les objectifs scientifiques sont atteints.

Raffiner :

1.. Tout au long de l'opération, les souris seront anesthésiées à l'isoflurane, et réchauffées, en utilisant aussi une anesthésie locale (spray de xylocaïne) sur les plaies. Les animaux recevront en postopératoire un traitement analgésique (buprénorphine durant 72 h) et un régime normal ad libitum.

2. Au cours de l'étude, les souris seront observées et surveillées chaque jour pour garantir leur bien-être animal. Si nécessaire, la décision d'euthanasie sera prise et réalisée pour éviter toute souffrance inutile.

12561 Etant donné la continuité entre les différents milieux aquatiques, la vérification de la qualité des masses d'eau doit être effectuée à différents niveaux : eau douce, milieux estuarien et côtier. Dans ce cadre, l'utilisation d'une seule espèce sentinelle pour l'étude de la qualité de la masse d'eau est difficile. Il semble donc nécessaire de comparer les réponses biologiques de différentes espèces pouvant survivre dans les différents milieux afin d'avoir une vision globale de l'effet des contaminants sur les écosystèmes. Le but de cette étude est donc de proposer une méthodologie et des outils de diagnostic, permettant d'évaluer et de comparer la qualité des masses d'eau sur l'ensemble du continuum eau douce – eau salée en utilisant quatre espèces différentes : le flet et la moule pour les eaux salées, l'épinoche et la dreissène pour l'eau douce.

Cette étude s'intéressera uniquement au modèle épinoche, espèce largement représentée en analyse du risque environnemental et dans les rivières françaises et européennes, avec une approche multi-biomarqueurs focalisée sur la santé et la reproduction de l'individu, incluant ainsi l'immunotoxicité, la génotoxicité et la reprotoxicité. Cependant, afin d'éviter toute erreur de diagnostic de la qualité de la rivière, il est préalablement nécessaire de déterminer les effets des facteurs de confusion biotique et abiotiques (taille, poids, sexe, ...) sur les biomarqueurs utilisés (procédure 1). Pour ce faire, après deux semaines d'acclimatation, des épinoches de laboratoire seront exposées pendant un mois à différentes gammes de température, de salinité, de conductivité, de pH et d'oxygène en lien avec les paramètres physico-chimiques naturellement retrouvés sur le terrain. Pour les facteurs biotiques, leur prise en compte se fera par l'intermédiaire

d'un suivi bimestriel sur un an de nos poissons d'élevage réparti en 4 classes de taille différentes. Les paramètres ainsi étudiés permettront de mieux appréhender l'effet des facteurs confondants lors des encagements de poissons sur le terrain.

Lors de la seconde procédure, pour laquelle l'axe Seine est la zone d'étude, nous pourrions prendre en considération les effets des facteurs de confusion sur nos analyses multi-biomarqueurs. Nous pourrions ainsi mieux percevoir les impacts de la contamination chimique sur nos biomarqueurs pour tenter de définir des cartes d'effets toxiques qui seront comparées aux connaissances déjà disponibles sur la contamination du milieu (procédure 2). Pour y répondre, nous encagerons pendant 21 jours des épinoches sur 8 sites représentatifs de l'axe Seine et de ces affluents. Ce projet permettra la construction d'une démarche visant à être pérennisée et transférable aux gestionnaires en proposant, de façon originale, de considérer l'encagement d'organismes calibrés pour un diagnostic plus précis de la qualité des masses d'eau. Au final, ce projet contribuera également à fournir des réponses aux attentes des acteurs de l'eau, notamment celles listées dans le recueil « Besoins de développements en matière de surveillance et d'évaluation Directive Cadre sur l'Eau de l'état des eaux et des milieux aquatiques » établi par l'Agence Française pour la Biodiversité.

La règle des 3R a été prise en considération :

- Remplacer : comme nous souhaitons prendre en considération l'intégralité des réponses physiologiques, nous nous basons sur des organismes vivants sans Remplacer de ces derniers par des techniques alternatives trop spécifiques de quelques réponses physiologiques.

Réduire : Néanmoins, nous réduirons au maximum le nombre d'animaux nécessaire (1220 épinoches) pour obtenir une significativité des résultats (test de puissance).

Raffiner : Les animaux vont bénéficier d'une eau adaptée en termes de paramètres physico-chimiques et d'une période d'acclimatation suffisamment longue pour limiter le stress dû aux expérimentations. Concernant la procédure 1, en suivant la grille de score Fraunhofer Institut, les expérimentations sont immédiatement arrêtées si une mortalité anormale (supérieure à 5 %), des lésions externes, un comportement de nage ou une respiration anormale sont observés dans les aquariums témoins. Les poissons sont alors euthanasiés à l'aide d'une surdose d'anesthésiant MS 222 (concentration de 200 à 300 mg/L au minimum selon l'âge et la taille des poissons) pour éviter toute souffrance. Les poissons sont maintenus dans la solution pendant au moins 10 minutes suivant l'arrêt des mouvements operculaires. Pour la procédure 2, avant encagement, les conditions physico-chimiques des sites sélectionnés seront mesurées (pH, conductivité, oxygénation, et température) afin d'acclimater à ces conditions les animaux en laboratoire pendant 14 jours. Pendant cette acclimatation, les animaux sont observés quotidiennement en se référant à la grille de score Fraunhofer institut. Si les conditions d'acclimatation rejoignent les points limites de la procédure 1, l'acclimatation sera stoppée et les poissons en souffrance seront euthanasiés. Ces sites seront alors éliminés de l'expérimentation puisque les cages ne pourront être déposées que dans des zones compatibles avec les conditions de vie de l'épinoche (bord de rivière, ombragée, courant faible, bonne oxygénation ...). Au cours de ce projet, toutes les expérimentations sont en accord avec la Directive 2010/63/EU, qui s'intéresse à la protection et au bien-être des animaux utilisés à des fins scientifiques, pour le maintien et l'utilisation des animaux en laboratoire.

12562 Les troubles fonctionnels intestinaux (TFI) regroupent un ensemble de pathologies coliques dont le syndrome de l'intestin irritable (SII) est la plus fréquente. Les TFI affectent 10 à 20% de la population adulte occidentale, le SII représentant plus de 20% de ces pathologies intestinales. Le SII est défini, selon les critères de Rome IV, par des douleurs abdominales et/ou un inconfort digestif associés à des modifications du transit (fréquence et consistance des selles). Les sujets souffrants de SII peuvent ainsi être divisés en 3 sous-groupes : SII-D (diarrhée), SII-C (constipation), et SII-M (mixte : alternance de diarrhée et constipation). Le SII représente l'une des causes majeures de consultation en gastroentérologie (plus de 30% des consultations), ce qui fait de cette pathologie un véritable enjeu de santé publique. Il est, de plus, reconnu comme un facteur majeur affectant la qualité de vie des individus qui en souffrent. L'origine de ces troubles fonctionnels intestinaux reste cependant mal connue. L'alimentation, le stress, la génétique ainsi que le microbiote intestinal sont étudiés

pour leur implication dans ce syndrome. En effet, de plus en plus études s'accordent sur le rôle potentiel du microbiote intestinal dans l'étiologie du SII. Elles démontrent que le microbiote intestinal des sujets présentant le SII est différent de celui des sujets sains. Cet écosystème microbien complexe est composé de plusieurs centaines d'espèces différentes, majoritairement anaérobies strictes et a pour fonction majeure la dégradation de la matière organique présente dans le côlon (fibres alimentaires, les protéines, le mucus...) via les processus de fermentation bactérienne. L'utilisation de ces différents substrats aboutit principalement à la production d'acides gras à chaîne courte (acétate, propionate, butyrate) et de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone, sulfures et méthane chez certains sujets). Ces métabolites sont en partie absorbés par la muqueuse intestinale et jouent un rôle dans des processus physiologiques (nutrition, douleur, système immunitaire, perméabilité etc.). Ainsi, la présence d'un déséquilibre au sein du microbiote intestinal peut conduire à des modifications des processus fermentaires, mais aussi de la physiologie colique. A ce jour, l'impact bénéfique des probiotiques dans la prévention et/ou le traitement de troubles du transit associés à des perturbations de la composition du microbiote (diarrhée du voyageur, diarrhée induite par les antibiotiques) permet de démontrer le lien entre microbiote et trouble du transit. De récentes études démontrent de plus que l'administration d'une espèce commensale, *Blautia hydrogenotrophica* (BlautiX - 4D pharma), à des animaux hébergeant le microbiote de sujet SII possède un impact bénéfique sur la dysbiose fonctionnelle associée à cette pathologie (composition et activité) et la sensibilité viscérale. Dans ce contexte, l'utilisation de cette bactérie probiotique dans le traitement des troubles du transit chez les individus souffrant de SII (C ou D) représente une stratégie encourageante.

L'objectif du projet sera d'étudier si l'administration préventive ou curative de *Blautia hydrogenotrophica* est capable de traiter les troubles du transit et d'identifier les mécanismes (microbien et/ou réponse de l'hôte) potentiellement impliqués. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'impact du probiotique sur le microbiote, son activité fermentaire mais aussi la physiologie colique (temps de transit, perméabilité, réponse de l'hôte). Deux modèles animaux seront utilisés afin de réaliser ces études. Tout d'abord des rats Fischer F344 gnotoxéniques à microbiote intestinal humain SII constipés ou diarrhéiques, et des rats Fischer 344 conventionnels dans lesquels une diarrhée pourra être induite à l'aide d'huile de castor.

Pour le respect de la règle des 3Rs

Remplacer : Le temps de transit et de l'impact d'un traitement probiotique ne peut être évalué que sur un organisme vivant pris dans sa globalité, nécessitant pour ce projet l'utilisation d'animaux.

Réduire : le nombre de chaque groupe d'animaux a été réduit au minimum nécessaire pour discriminer un effet statistiquement significatif entre les traitements, ainsi 240 animaux seront utilisés pour ce projet.

Raffiner Les expériences proposées induisent un niveau de stress et de douleur légers et tout au long de l'expérimentation une surveillance sera mise en place pour détecter, réduire ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux. Des antalgiques seront administrés aux animaux si nécessaire et chaque expérience sera exploitée au maximum pour réduire le nombre d'animaux utilisés.

12563 L'amélioration des performances de croissance en production avicole s'est effectuée grâce à la sélection génétique et à une optimisation de l'alimentation, mais elle a été réalisée au détriment de la santé des animaux associée à une augmentation de l'incidence des maladies infectieuses. Ainsi, certaines bactéries présentes dans l'intestin, et à ce stade sans danger pour l'hôte, profiteraient d'une infection parasitaire très fréquente chez le poulet de chair (coccidiose due au parasite *Eimeria tenella*) pour pénétrer puis disséminer dans l'organisme, ce qui peut conduire à une infection sévère. Actuellement ce parasite est contrôlé par des anticoccidiens, mais l'apparition de résistance à ces produits, ainsi que la demande des consommateurs pour la Réduire des additifs utilisés en alimentation animale, nécessite la recherche de solution alternative. Une solution pourrait être l'utilisation de l'alimentation. En effet ce parasite est fortement dépendant du microbiote intestinal, or celui-ci peut être modulé par l'alimentation en modifiant le fonctionnement digestif.

Nous proposons donc d'étudier l'effet de facteurs alimentaires pouvant influencer ce microbiote, et par conséquent le développement d'E. tenella, et donc la dissémination de bactéries dans l'organisme.

Au total, 504 animaux seront nécessaires pour réaliser ce projet. Celui-ci respecte le principe des 3R :

Remplacer : L'effet de l'alimentation sur l'appareil digestif et son microbiote, ainsi que ses conséquences sur le développement d'E. tenella, et le passage des bactéries dans le sang font intervenir des mécanismes complexes qui actuellement ne peuvent pas être remplacés par un modèle d'étude in vitro.

Réduire : Le nombre total d'animaux a été calculé comme étant l'effectif nécessaire pour réaliser les prélèvements concernant l'étude du fonctionnement digestif et du microbiote digestif, l'étude de l'intégrité intestinale et l'inflammation, ainsi que l'étude du passage des bactéries dans le sang. Ces nombres d'animaux ont été déterminés pour obtenir une différence significative entre traitement et pertinente d'un point de vue biologique sur des critères liés au fonctionnement digestif, à la charge parasitaire, l'intégrité intestinale et l'inflammation, ainsi qu'au passage des bactéries dans le sang.

Raffiner : Pour limiter au maximum le stress et la douleur des animaux, plusieurs mesures seront prises. Les animaux seront élevés sur litière en groupes de 13 animaux permettant des comportements de grattage et d'exploration, ainsi qu'une interaction sociale entre individus. La densité d'élevage finale sera inférieure à celle correspondant à la pratique en élevage conventionnel. Les animaux seront suivis quotidiennement pour s'assurer de l'absence de symptômes tels que définis dans les points limites concernant l'infection par E. tenella.

12564 Parmi toutes ses fonctions, le principal rôle du muscle squelettique est de générer une force pour induire le mouvement et la locomotion. Pour assurer sa fonction contractile, le sarcomère, plus petite structure contractile du muscle squelettique, doit être strictement organisé en un réseau de protéines extrêmement complexe et interconnecté, appelé cytosquelette sarcomérique, au sein duquel une protéine de structure, la desmine, joue un rôle essentiel.

Le but de ce projet est d'analyser des mécanismes qui seraient responsables du maintien de la structure de la cellule musculaire striée pour envisager la modulation de ces mécanismes comme stratégie thérapeutique dans certaines pathologies caractérisées par une altération structurale, des agrégations anormales de protéines, telles les myopathies myofibrillaires. Notre intérêt se porte sur une glycosylation particulière qui concerne de nombreuses protéines du sarcomère et du cytosquelette et jouerait un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la structure de la cellule musculaire et d'analyser les conséquences au niveau de l'activité contractile du muscle et de sa structure.

Sur un modèle animal, nous analyserons l'effet d'une modulation de cette glycosylation par une stratégie de siRNA sur l'intégrité du sarcomère, l'interactome de la desmine et la modulation de la fonction contractile. La fonction contractile sera déterminée, de même que les répercussions sur la locomotion. Les données découlant de ce projet permettront de déterminer si la O-GlcNAcylation peut améliorer la force musculaire, la fonction musculaire étant souvent déficiente dans de nombreuses pathologies musculaires. A terme, ce projet permettra de définir de nouveaux outils destinés à améliorer la fonction musculaire, ce qui pourrait avoir des répercussions importantes dans diverses pathologies conduisant à une perte de fonction du muscle.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

Remplacer : L'objectif de ce projet est d'évaluer si, des modifications des niveaux de O-GlcNAcylation du muscle gastrocnémien sont susceptibles de modifier les propriétés fonctionnelles in vivo du muscle strié squelettique associées à des modifications de l'ultrastructure du sarcomère et de l'interactome de la desmine. L'utilisation d'animaux vivants revêt donc un caractère de stricte nécessité.

Raffiner : Le choix de l'utilisation d'un modèle de rats mâles est basé sur les résultats de la littérature ayant montrés l'efficacité de la stratégie expérimentale proposée pour augmenter le niveau de glycosylation des protéines musculaires et des données du laboratoire. Dans tous les protocoles,

l'ensemble des procédures expérimentales sera réalisé en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux utilisés par la mise en place de période d'accoutumance et l'emploi d'anesthésiant et antalgique adaptés. Les animaux seront hébergés par groupe de 3 individus par cage avec un enrichissement du milieu. Par ailleurs, l'évaluation de la souffrance sera basée sur un suivi journalier (attitude corporelle, aspect du pelage, poids corporel) ainsi qu'un suivi bihebdomadaire de la prise alimentaire de sorte à administrer un traitement antiinflammatoire/antalgique supplémentaire, ou sortir un animal de l'étude en cas d'atteinte des points limites établis.

Réduire : Pour chacun des groupes constitués, le nombre d'animaux (n=12 par groupe) a été réduit au maximum suivant la loi des 3R tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisant (différences statistiquement observables entre les animaux traités et les animaux contrôles). Ce projet concernera 114 rats/3 ans.

12565 La réglementation en vigueur concernant la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques) requiert que le personnel soit compétent. Le personnel de notre institut suit les formations théoriques obligatoires. Afin de compléter cette formation, nous offrons à nos nouveaux arrivants ainsi qu'au personnel souhaitant maintenir ses compétences techniques, la possibilité de réaliser les techniques d'administration ou de prélèvements sanguins faits en routine dans nos animaleries.

Cette formation continue permet ainsi à nos techniciens d'être compétents et de réaliser l'ensemble des projets de l'institut dans les meilleures conditions pour les animaux. Respect de la règle des 3R :

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

Réduire : Dès que possible, les animaux servant aux formations proviendront d'autres projets terminés et de sévérité légère à modérée. Sachant que les animaux pourront faire un maximum de 3 procédures, un maximum de 1150 animaux sera nécessaire par an pour assurer la formation continue et le maintien de compétences de l'ensemble du personnel soit 5750 animaux sur toute la durée du projet.

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

12566 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie qui touche 0,5-1% de la population mondiale, à raison de trois femmes pour un homme. La PR se caractérise une inflammation des articulations avec une prolifération non-contrôlée de leurs cellules : les synoviocytes, qui refusent d'entrer en mort cellulaire programmée (apoptose). Malgré les progrès thérapeutiques, cette inflammation des articulations persiste chez certains patients et détruit les articulations. Notre équipe a récemment observé sur cellules humaines l'implication de nouvelles cibles thérapeutiques potentiels : YAP/TAZ. Ces deux molécules sont activées dans les cellules humaines de patient atteints de PR cette activation peut se faire à la fois par l'environnement inflammatoire, mais aussi de façon mécanique par une rigidification de l'environnement cellulaire. L'utilisation d'un inhibiteur chimique de YAP/TAZ, la verteporfine a permis de montrer sur nos modèles in vitro, la Réduire de la prolifération des cellules synoviales, la restauration de leur mort programmé et la diminution de leur capacité d'invasion, ces 3 facteurs sont indispensables pour la destruction de l'articulation. De plus un modèle d'organoïde humain de membrane synoviale à montrer des effets prometteurs de la verteporfine pour les organoïdes modélisant l'arthrite (Réduire de l'hyperplasie de la membrane synoviale). La verteporfine est une molécule déjà utilisé en thérapeutique humaine pour une autre

indication. Nos résultats suggèrent donc une nouvelle utilisation possible de cette molécule dans le cadre de la PR.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : le passage à l'animal constitue donc à ce niveau une étape essentielle pour montrer l'efficacité de cette molécule sur la maladie mais aussi d'approfondir la compréhension de l'implication de YAP/TAZ dans la maladie, avant d'envisager une approche chez l'humain. Le modèle choisi est l'arthrite induite par adjuvant chez le rat, pour son apport dans les pathologies arthritiques et sa bonne ressemblance en termes de physiologie.

Réduire : Le design de l'étude a été une longue discussion entre les différentes personnes impliquées dans le projet afin de réduire au maximum le nombre de groupes et le nombre d'animaux par groupe tout en garantissant une qualité d'analyse pertinente. Notre projet inclura au maximum 132 rats.

Raffiner : Enfin, nous avons cherché à raffiner les étapes de l'expérimentation : les injections intra articulaire seront réalisées sous anesthésie gazeuse, le suivi clinique de chaque animal sera réalisé grâce à des indicateurs systémiques et locaux reconnus dans l'arthrite, et plusieurs points limites ont été mis en place. De plus, l'arthrite étant invalidante pour l'animal nous avons adapté les moyens d'accès à la nourriture et à l'eau et rajouter un abri (tunnel opaque rouge) qui permet à l'animal d'être caché tout en permettant à l'expérimentateur de l'observer et d'évaluer une éventuelle douleur.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et géré grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 2) ; dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux .

12567 L'infection à *Mycobacterium ulcerans*, ou ulcère de Buruli, est une maladie négligée émergente, représentant la troisième mycobactériose après la tuberculose et la lèpre chez les sujets immunocompétents. Cette infection, qui touche principalement les enfants, est diagnostiquée principalement dans les zones humides de l'Afrique de l'Ouest et Centrale. L'ulcère de Buruli est responsable de vastes ulcérations cutanées très invalidantes et stigmatisantes. Les premiers signes cliniques cutanés, non ulcératifs et peu ou pas douloureux, apparaissent après une incubation de plusieurs semaines suite à l'inoculation. Ils évoluent vers une ulcération cutanée indolore dont l'extension peut être importante, due à la mycolactone, principal facteur de virulence du bacille et responsable du caractère indolore des lésions.

L'objectif du projet est d'étudier les voies moléculaires et cellulaires à la base du contrôle de la douleur par la toxine mycolactone sécrétée par *M. ulcerans* et l'élaboration de nouvelles stratégies de découverte de nouvelles molécules aux propriétés analgésiques.

Ce projet se justifie puisque l'arsenal thérapeutique contre la douleur reste limité, d'où l'intérêt des solutions analgésiques naturelles, optimisées par l'évolution. Le projet s'appuie sur un tel système implémenté dans la maladie de l'Ulcère de Buruli, pour laquelle nous avons montré que la toxine bactérienne mycolactone qui provoque les lésions joue en même temps un rôle d'antidouleur à action longue durée, en se fixant au récepteur de l'angiotensine II de type 2 conduisant à une hyperpolarisation neuronale médiée par le canal potassique TRAAK.

Plus précisément, nous allons évaluer *in vivo* les propriétés analgésiques de composés lactones, ayant montré un effet hyperpolarisant comparable ou supérieur à celui de la mycolactone *in vitro*, et en comparaison aux propriétés analgésiques de la morphine.

Au préalable, les voies moléculaires et cellulaires à la base du contrôle de la douleur par la mycolactone auront été étudiées sur des lignées cellulaires, puis validées sur des cellules

neuronaux primaires, prélevées sur l'animal. D'autre part, il aura été démontré que les composés à évaluer sont capables d'hyperpolariser les cellules.

A terme, ce travail doit aboutir à la mise au point de nouveaux analgésiques puissants. L'utilisation de modèles *in vivo* pertinents, telles que les souris C57BL/6 classiquement utilisées, constitue un prérequis pour la validation *in vivo* (i) des voies moléculaires mises en œuvre dans le contrôle de la douleur et (ii) de l'effet analgésique des composés, avant toute phase clinique sur l'homme. Brièvement, après que des souris aient été inoculées avec de la mycolactone et autres composés lactones-like, une évaluation de la perception de la douleur au niveau du point d'inoculation sera réalisée.

La règle des 3R a été prise en considération :

Remplacer : L'évaluation des interactions moléculaires au sein des cellules neuronales primaires prélevées chez des animaux permet de comprendre les mécanismes impliqués à l'échelle cellulaire mais nécessitent des modèles *in vivo* pertinents, donc des animaux vivants qu'il n'est pas possible de remplacer par des tests *in vitro*.

Par nos approches *in vitro*, nous avons d'ores et déjà identifié 2 composés lactones capables d'hyperpolariser les cellules sans effet cytotoxique.

Réduire : Sur les cinq ans de notre projet, 8 souris/mois toutes lignées confondues pourront être utilisées pour l'étude *in vitro*, pour la préparation des cellules neuronales primaires, soit 480 souris. Et environ 10 composés et dérivés pourront être à évaluer *in vivo* (soit 2 nouveaux composés par an évalués en comparaison avec la mycolactone naturelle et la morphine et des souris non traitées). Afin de permettre de générer des résultats statistiquement analysables et de montrer la reproductibilité des observations, les expériences seront répétées 2 fois sur souris wild-type avec un nombre de 8 animaux par groupe expérimental pour 1 concentration des composés retenus (soit 40 souris par composé), puis 3 nouvelles concentrations des composés ayant présenté un effet sur souris seront évaluées sur souris wild-type (soit environ 5 composés sur 5 ans et 96 souris par composé) et sur souris KO (soit environ 4 composés sur 5 ans et 320 souris KO par composé). Ainsi, environ 2640 souris, toutes lignées confondues, seront utilisées pour ce projet.

Raffiner : De façon à réduire le stress, l'inconfort et la douleur, les souris ne seront pas soumises à des traitements ou des prélèvements répétitifs. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter toute souffrance tout au long de leur vie. Les individus seront euthanasiés en fin d'expérience.

12568 Dans le domaine de l'infection bactérienne, la résistance aux antibiotiques constitue un problème majeur de santé publique. Ces résistances apparaissent souvent très rapidement après la mise sur le marché des antibiotiques agissant sur la croissance bactérienne. Elles sont dues à l'amplification de bactéries naturellement résistantes aux antibiotiques, sélectionnées par le traitement. Face à ce constat, de nouvelles stratégies anti-infectieuses sont en cours de développement. Elles visent à rechercher des drogues capables de limiter la virulence des bactéries pathogènes sans affecter la croissance bactérienne, afin de ne pas provoquer de résistance au traitement.

Ce projet se concentre sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, un pathogène responsable de maladies nosocomiales. Les souches cliniques de *P. aeruginosa* sont très souvent multi résistantes aux antibiotiques. C'est pourquoi l'Organisation Mondiale de la Santé a classé ce pathogène en priorité 1 pour la recherche de nouvelles stratégies anti-infectieuses.

La règle des 3R a été prise en considération :

Remplacer : Nous allons tester chez le rongeur des molécules visant à limiter l'action de deux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, considérés comme les plus toxiques de cette bactérie. Ces molécules ont permis d'inhiber très significativement la virulence des souches de *P. aeruginosa* dans des modèles d'infection cellulaire. Cependant, il n'existe pas à ce jour de modèle *in vitro* capable de récapituler l'ensemble des mécanismes d'infection telle qu'elle se déroule *in vivo* : effet des toxines sur les tissus, réaction inflammatoire, efficacité des drogues dans une structure

complexe et multi-compartimentée. L'expérimentation in vivo est donc une étape nécessaire dans la validation de molécules anti-infectieuses.

Réduire : Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés et sont nés et élevés en captivité. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire tout en restant suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Le nombre d'animaux utilisé pour ce projet sera au maximum de 380 souris en 5 ans. Une pneumonie sera induite par inhalation d'une suspension bactérienne et l'action des traitements par ces molécules sélectionnées sur l'évolution de l'infection sera comparée à celle des animaux traités avec un placebo

Raffiner : Le bien-être des animaux est assuré, durant l'élevage, par le suivi quotidien des animaux et la constitution de groupes sociaux. Notamment, les souris seront hébergées en groupe dans une cage enrichie avec du matériel pour la fabrication de nids. Les animaux seront anesthésiés lors de la procédure d'infection et des visites pluriquotidiennes seront effectuées pendant l'infection, afin d'évaluer des signes cliniques de souffrance. De l'alimentation géliifiée sera déposée dans la cage pour faciliter leur alimentation et prévenir leur déshydratation. Des critères d'arrêt d'expérimentation ont été déterminés et seront appliqués afin d'empêcher toute souffrance animale inutile.

12569 Une avancée majeure dans le traitement des cancers a été réalisée au cours de ces dernières années grâce à l'utilisation de l'immunothérapie. L'immunothérapie consiste à réactiver les cellules du système immunitaire contre les cellules cancéreuses. Malheureusement, bien que très efficace chez certains patients, une large proportion de personnes atteintes par le cancer ne répond pas à ces nouvelles thérapies (environ 80% des patients). De façon intéressante, de nombreuses études montrent à présent, que chez les patients traités par certaines immunothérapies, l'ajout d'une vaccination dirigée contre des antigènes tumoraux peut améliorer la destruction des cellules cancéreuses et la rémission ou la stabilisation des patients. Dans ce cas, l'efficacité de la réponse vaccinale dépend directement de la nature des antigènes sélectionnés pour cibler les tumeurs et de la capacité du système immunitaire à reconnaître efficacement ces antigènes.

Nous avons développé une méthode pour identifier des antigènes tumoraux fortement immunogènes. Notre méthode consiste à sélectionner des antigènes tumoraux semblables à des antigènes bactériens. Ainsi le système immunitaire est capable de reconnaître ces antigènes comme des antigènes étrangers et de monter une réponse immunitaire forte contre les cellules tumorales comme si la réponse immunitaire était dirigée contre une infection bactérienne. Utilisés pour la vaccination des patients, ces antigènes doivent permettre une meilleure prise en charge des patients.

L'objectif de notre projet est de confirmer expérimentalement les propriétés immunogènes de vaccins peptidiques sélectionnés par cette nouvelle approche. L'obtention de données expérimentales est nécessaire à la validation de ce nouveau concept scientifique. De plus, les peptides efficaces seront sélectionnés comme candidats vaccinaux pour des études cliniques.

Les premiers tests visant à évaluer les propriétés de nos peptides vaccinaux ont été réalisés in vitro sur des lignées cellulaires. Ces tests ont permis de présélectionner et de réduire le nombre de candidats thérapeutiques potentiels. Ces candidats doivent à présent être définitivement validés dans des modèles animaux qui restent les seuls modèles permettant d'étudier une réponse immunitaire complète telle qu'elle est attendue chez l'homme.

La reconnaissance des peptides / antigènes par le système immunitaire est dépendante de molécules capables de les prendre en charge (le complexe majeur d'histocompatibilité, CMH), ces molécules sont spécifiques de chaque espèce et sont donc différentes entre l'homme et la souris. L'étude de réponse immunitaire induite par nos candidats vaccinaux doit donc être réalisée chez des souris dites humanisées, qui expriment un des complexe majeur d'histocompatibilité humain, le CMH HLA-A2. Ce modèle de souris est parfaitement connu et maîtrisé en terme de réponse immunitaire aux vaccins peptidiques thérapeutiques restreint au HLA-A2 humain. Seule la réponse immunitaire engendrée par la vaccination sera analysée. Ce projet ne vise pas à l'évaluation directe d'une réponse anti-tumorale chez l'animal. La vaccination sera réalisée chez des animaux non porteurs de tumeur.

La règle des 3R a été prise en considération :

Remplacer : La mise en place d'une réponse immunitaire après vaccination est un phénomène complexe. L'étude d'une réponse immunitaire après vaccination sur organisme entier ne peut être remplacée et n'a pas d'équivalent expérimental n'utilisant pas d'animaux.

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire pour les études de ce projet a été calculé et réduit de façon à obtenir une significativité statistique des données. De plus des outils de Bio-informatique et la réalisation de test in vitro a permis de ne sélectionner pour les études animales, que des peptides vaccinaux ayant une très forte probabilité d'engendrer une réponse immunitaire après vaccination. Ce projet sera composé de 12 études visant à étudier différents peptides/mélanges vaccinaux sur le modèle de souris. Toutes ces études peuvent être considérées comme similaires d'un point de vue expérimental. Ces études comprendront chacune au plus 48 animaux (6 groupes de 8 souris), soit un total maximum de 576 animaux.

Raffiner : Les animaux seront maintenus dans des conditions environnementales contrôlées (température, humidité, cycle jour / nuit), dans un espace suffisant, en groupe pour maintenir les interactions sociales, et avec un enrichissement environnemental permettant de répondre aux besoins physiologiques et comportementaux des souris. Toutes les manipulations seront donc réalisées dans le respect de l'animal. Le temps de manipulation des animaux sera de plus réduit au maximum afin de réduire le stress des animaux et l'impact possible sur la réponse immunitaire. La procédure expérimentale (vaccination) est de classe de gravité légère et ne nécessite pas d'y associer un protocole d'anesthésie. Néanmoins des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter toute souffrance tout au long de leur vie.

12570 L'imagerie par résonance magnétique permet de détecter de façon indirecte les métaux dans un organisme vivant. Il est ainsi possible de détecter le fer, le gadolinium ou encore le manganèse.

L'ion manganèse est utilisé depuis longtemps en imagerie par résonance magnétique (IRM). Analogue du calcium, il peut prendre sa place dans les neurones. Ces deux caractéristiques en font un puissant agent de contraste IRM utilisé dans les études d'imagerie cérébrale chez l'animal sain ou sur des modèles expérimentaux de pathologies du système nerveux central.

La MEMRI est l'imagerie du manganèse en IRM. Elle permet essentiellement : d'améliorer la visualisation de l'architecture cérébrale, de suivre des connexions spécifiques entre neurones dans le cerveau (réseaux neuronaux) et de visualiser l'activité neuronale.

Bien que les mécanismes de transport, de distribution et de toxicité cérébrale du manganèse restent encore mal connus, la MEMRI est de plus en plus utilisée en recherche préclinique.

Dans un premier temps, ce projet consistera à implémenter la technologie au laboratoire. Des développements méthodologiques sur animaux sains permettront d'améliorer l'acquisition des données et le traitement des images et de définir la meilleure fenêtre d'observation pour l'imagerie cérébrale chez la souris

Dans un deuxième temps, nous souhaitons éprouver la MEMRI, avec des protocoles optimisés lors des étapes décrites ci-dessus, pour sa capacité à mettre en évidence des atteintes neuronales dans des modèles expérimentaux de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou les tauopathies. Dans ce projet, nous aurons recours à un modèle murin de tauopathie déjà bien décrit dans la littérature et que nous avons déjà utilisé au laboratoire.

La règle des 3R a été prise en considération :

Remplacer : Aujourd'hui, ni la modélisation informatique, ni l'expérimentation sur cellules in vitro ne permettent encore d'appréhender des processus très complexes relevant du développement des maladies neurodégénératives. Le recours à l'animal dans ce projet est donc nécessaire

Réduire : L'IRM est une technique indolore et non invasive pour les animaux. L'intérêt de cette technologie d'imagerie réside donc aussi dans le fait qu'elle permet de répéter les examens sur les mêmes animaux et de suivre ainsi in vivo l'installation et l'évolution de processus pathologiques au sein des modèles expérimentaux. De ce fait, nous réduisons donc le nombre d'animaux impliqués

dans les études précliniques en évitant le recours systématique à l'analyse post-mortem. Le projet prévoit l'utilisation d'un total de 133 souris sur les 5 ans du projet.

Raffiner : les animaux seront hébergés en groupe, en milieu enrichi, avec accès à l'eau et à la nourriture de façon ad libitum. Les expériences se feront sous anesthésie générale. Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêts permettront de veiller au bien-être des animaux.

12571 La thérapie génique qui consiste à « réparer » un gène déficient est parfois la seule approche thérapeutique pour traiter des maladies génétiques telle que la mucoviscidose, la dystrophie musculaire de Duchenne. Son intérêt pour le développement de stratégie innovante pour le cancer est également démontré. La thérapie génique a démontré sa faisabilité chez l'homme avec les récents résultats obtenus par des équipes françaises. Des vecteurs sont nécessaires pour véhiculer le gène médicament. Ces vecteurs peuvent être synthétiques ou viraux. Des vecteurs synthétiques sont en développement pour remplacer dans le futur, les vecteurs viraux, immunogènes et coûteux à produire. Nous développons des complexes de nanoparticules qui seront utilisés pour réaliser un transfert de gènes. Ces vecteurs sont mis au point, testés et sélectionnés sur la base de leur activité sur différentes lignées cellulaires in vitro. Cependant, la finalité de ces vecteurs est d'être efficace in vivo. Nous souhaitons connaître le potentiel de ces vecteurs à faire exprimer le gène médicament au niveau des cellules hépatiques de souris saines. En effet, le foie est un organe privilégié pour la thérapie génique de plusieurs maladies génétiques telles que l'Hémophilie B.

La finalité est de sélectionner les nanoparticules les plus efficaces pour transfecter le foie sur la base de l'expression d'un gène rapporteur et de leur biodistribution. Les travaux seront menés selon la règle des 3 R :

Remplacer : Cette étude ne peut être réalisée que chez le petit animal puisque les tests in vitro ne peuvent tenir compte des aspects physiologiques et de la complexité d'un organisme entier. Pour cela nous envisageons de réaliser une série d'expériences avec des souris saines.

Réduire : Les approches par imagerie in vivo permettent de réduire le nombre d'animaux au minimum grâce à la possibilité d'un suivi longitudinal. Nous estimons que pour ce projet de 2 ans il sera nécessaire de mettre en œuvre 390 souris maximum.

Raffiner Les approches par imagerie in vivo, non invasives, permettent de réduire la souffrance de nos animaux Les travaux seront par ailleurs menés sur des souris anesthésiées et saines et nous n'attendons pas de dommages particuliers liés aux vecteurs. Une surveillance pointue des animaux sera mise en œuvre et des points limites ont été déterminés afin d'anticiper toute souffrance qui apparaîtrait lors de nos études.

12572 La fibrose hépatique est une réparation excessive résultant de l'accumulation de tissu conjonctif dans le foie qui finit par désorganiser l'architecture du foie et perturbent son fonctionnement. La matrice extracellulaire est produite en excès et/ou insuffisamment dégradée. Le déclencheur est une agression chronique surtout en cas de composante inflammatoire.

Les mécanismes impliqués dans la survenue de la fibrose sont complexes, mais l'inflammation joue un rôle primordial et les macrophages y occupent une place privilégiée. Ces cellules du système immunitaire secrètent en effet des facteurs d'inflammation (cytokines) et contribuent à la progression de la maladie.

La phase préclinique qui consiste à l'étude de l'action des agents pharmacologiques in vivo chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments anti-fibrotiques et anti-inflammatoires.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6. Ces animaux vont recevoir une dose croissante de CCL4 (molécule de la famille des organo-halogénés volatils) par voie orale Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études, incluant au maximum 90 animaux, soit 1800 animaux au total.

La règle des 3R a été prise en considération :

Remplacer : A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant la fibrose hépatique. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale. Le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

Raffiner : Ce modèle induit des douleurs inflammatoires aiguës à l'animal, liées au développement de la maladie (classement sévère). Une surveillance deux fois par jour des animaux y compris les week-ends est effectuée pendant toute la durée de l'expérimentation et une surveillance quotidienne est effectuée durant la période d'acclimatation. Les conditions d'hébergement sont celles qui sont requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur. Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur et le stress au moment de l'expérimentation. Par ailleurs, des points limites suffisamment précoces sont définis pour éviter toute souffrance tout au long de leur vie.

12573 Le but de ce projet est d'évaluer la biodistribution de formulations d'acides nucléiques qui pourraient être utilisées en thérapie anticancéreuse. Ces formulations sont des structures proches des liposomes désignés lipopolyplexes ou LPP. L'objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel de formulations dont l'objectif est de déclencher une immunité anti cancer (vaccin).

Ainsi, dans un contexte où il existe un besoin toujours important de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cancer, ce type d'approche s'appuyant sur la stimulation de l'immunité constitue une nouvelle approche.

Deux types de formulations LPP seront évalués :

- un vaccin préventif à base d'Acide Ribo Nucléique (ARN) injecté à des souris saines
- et un vaccin thérapeutique injecté à des souris porteuses de tumeurs orthotopiques de cancer du sein.

Le vaccin préventif doit délivrer l'ARN dans les organes lymphoïdes comme les ganglions et la rate. Pour le vaccin thérapeutique, l'ARN doit se distribuer à la fois dans les organes lymphoïdes et dans la tumeur. Afin de favoriser la distribution des ARN vers leurs cibles, nous « accrocherons » des structures (ligands) aux formulations, afin d'améliorer leur distribution dans les tissus cibles, et nous analyserons l'impact de ces ligands sur la biodistribution des formulations.

Ces travaux seront réalisés par imagerie in vivo. Nous estimons que le nombre d'animaux sera de 210 souris.

La règle des 3R a été prise en considération :

Remplacer : Il n'est pas possible actuellement de réaliser une étude de ciblage ou de biodistribution d'un composé uniquement in vitro compte tenu de la complexité d'un organisme entier

Réduire : L'imagerie in vivo permet de réaliser un suivi longitudinal du même animal et permet donc de réduire le nombre d'animaux mis en œuvre.

Raffiner : L'imagerie in vivo est une modalité non invasive et non traumatisante pour l'animal. Nous n'attendons pas de dommages pour les études réalisées chez les souris saines autres que celles engendrées par la piqûre d'une aiguille. Concernant les souris porteuses de tumeurs mammaires, les dommages attendus sont liés aux développements d'une tumeur et nous mettrons en place un suivi ainsi que des points limites pertinents permettant d'anticiper toute douleur ou stress qui pourraient être provoqués chez l'animal.

12574 Les maladies du cerveau représentent un problème majeur de santé publique. La découverte de candidats médicaments et leur développement sont connus pour être très longs. La situation est encore plus dramatique pour les composés ciblant le système nerveux central ; le taux d'accès à la première administration chez l'homme et au dépôt de dossier d'autorisation de mise sur le marché est plus faible que pour d'autres axes thérapeutiques. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le système nerveux central exige une évaluation précise du mode d'action et de la neurotoxicité des composés en développement. Cette information doit être obtenue le plus tôt possible afin de remédier aux situations d'échecs au stade du développement clinique. Le manque d'efficacité et la présence de phénomènes inattendus de neurotoxicité sont les principales causes d'échec des projets de R&D pharmaceutiques au stade des essais cliniques. Il est donc important de développer une stratégie précoce permettant d'apprécier l'efficacité après le passage cérébral et d'évaluer la neurotoxicité d'un candidat médicament.

L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité/la neurotoxicité de composés en développement. Nous procéderons à l'administration de composés sur des rongeurs (souris et rats) sauvages. Les modifications du réseau neuronal induites par l'administration unique ou répétée des composés par voie entérale ou parentérale seront évaluées, après la période d'administration, par des enregistrements électrophysiologiques sur animal vigile ou anesthésié. Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera 1515 rats et 2525 souris et permettra de tester les effets neurotoxiques/neuroprotecteurs de composés en développement. L'électrophysiologie est une technique très puissante qui permet l'enregistrement de l'activité électrique à l'échelle d'un réseau de neurones. Plusieurs paramètres électrophysiologiques peuvent être mesurés sur un même animal :

-l'activité des neurones situés dans une structure cérébrale donnée.

-la plasticité synaptique (modulation des connexions entre les neurones dans le cerveau, les synapses étant les points de contacts entre les neurones) est considérée comme un élément fondamental de la mémoire et se mesure par la potentialisation à long terme.

-l'activité oscillatoire : l'activité globale des neurones d'une structure donnée oscillent selon certains rythmes, à différentes fréquences (de 0 à 150 Hz). Ces oscillations reflètent l'état de vigilance.

La règle des 3R a été prise en considération :

Remplacer : L'étude du système nerveux, de par sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et ainsi aboutir au développement de nouvelles thérapies pour des pathologies neurodégénératives. Nos expérimentations seront réalisées chez le rat ou la souris ; ces rongeurs, de petite taille et d'élevage facile, possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

Réduire : le nombre de rongeurs utilisé a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Sur un même animal, nous pourrions enregistrer simultanément différents paramètres électrophysiologiques (plasticité synaptique, transmission synaptique de base, activité neuronale). L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

Raffiner : à leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (jouets, copeaux de bois à grignoter, contact visuel et olfactif entre les animaux, musique, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum.

Pour les études sur l'animal vigile, suite au placement par chirurgie des électrodes d'enregistrement, il se peut que les animaux présentent des signes de douleur malgré les précautions prises pendant la phase de chirurgie (analgésiques, anesthésiques) et en post-opératoire (antibiotiques). Des

points limites préalablement définis permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces en cas de souffrance.

Suite à l'administration des composés à tester, il se peut que des signes d'inconfort ou d'intolérance se manifestent. Dans ce cas, les points limites préalablement définis et adaptés à l'espèce et à chaque mode d'administration permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces et adaptées en cas de souffrance animale. Avant l'étape de chirurgie nécessaire au placement des électrodes d'enregistrement, les animaux seront acclimatés pendant une période d'au moins 5 jours.

Pendant l'étape de chirurgie, plusieurs mesures seront mises en place afin de réduire au maximum la douleur : utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques, application de gel ophtalmique afin d'éviter le dessèchement de la cornée, maintien d'une température constante.

Pour les études sur animal vigile, après l'étape de chirurgie, les animaux seront isolés afin d'éviter tout dommage au niveau des implants ou l'apport de germes susceptibles de provoquer une infection.

Avant le début d'administration des composés, une période de récupération post-chirurgicale d'au moins une semaine sera respectée. Pendant la période d'administration des composés, une observation journalière des animaux sera mise en place. Des points limites préalablement définis et adaptés à chaque mode d'administration permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de leur bien-être (souffrance, stress, angoisse). En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée. Si les signes de souffrance persistent, les animaux seront mis à mort.

12575 Le traitement du cancer par immunothérapie est une avancée clinique majeure. L'immunothérapie consiste à faire combattre le cancer par le propre système de défense du patient, soit en stimulant son système immunitaire, soit en bloquant les mécanismes qui l'inhibent. Ces deux méthodes permettent de restaurer une réponse immunitaire efficace et robuste. La preuve de concept de cette nouvelle approche thérapeutique a été réalisée initialement pour les mélanomes cutanés, à l'aide d'anticorps qui sont désormais utilisés couramment en clinique. D'autres traitements du même type, ciblant d'autres cancers, sont maintenant également disponibles ou en cours de développement. Au préalable, ces thérapies ont été évaluées *in vitro*, mais il est indispensable d'évaluer leur efficacité dans des organismes vivants.

Nous allons, dans un premier temps, développer et optimiser un modèle préclinique de souris humanisées, ce sont des souris immunodéficientes reconstituées avec des cellules du système immunitaire humain.

Dans un deuxième temps, ces souris seront injectées avec des cellules tumorales humaines ou greffées avec des fragments de tumeurs de patients pour différents types de cancer sélectionnés (entre autres mélanome cutané, mélanome de la choroïde, cancer du sein, du poumon et de l'ovaire). Enfin les thérapies seront administrées par gavage oral ou injection sous-cutanée, intrapéritonéale et intraveineuse. Tous les patients ne répondent pas aux immunothérapies, ce projet devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de résistance au traitement et de choisir la ou les « molécules candidates » les plus prometteuses dans le traitement du cancer.

La règle des 3R a été prise en considération :

Remplacer : Après des étapes de screening par des approches *in vitro*, l'évaluation préclinique des traitements est nécessaire dans un système plus physiologique représentant un organisme vivant intégré tel que le souris. Cette étape indispensable nécessite l'utilisation d'animaux vivants pour tester d'éventuelles toxicités de ces traitements avant le passage à une phase clinique chez l'Homme.

Réduire : Le nombre d'animaux est évalué à 9296 souris sur 5 ans. Ce nombre a été réduit au minimum tout en assurant une puissance statistique significative des résultats obtenus.

Raffiner : Les animaux seront particulièrement surveillés lors des procédures. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux souris, les greffes de tumeurs se dérouleront sous

anesthésie générale et des antalgiques sont prévus. Des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. r.

12576 Ce projet de recherche fondamentale vise à déterminer si l'activation au cours du sommeil paradoxal du cortex rétrosplénial est importante pour la mémoire.

Occupant un tiers de notre vie, le sommeil est un besoin vital entre autre pour préserver nos capacités mentales. Le sommeil chez les mammifères n'est pas homogène et s'organise en deux états distincts. Caractérisé par un ralentissement de l'activité sur l'électroencéphalogramme, le sommeil lent se distingue du sommeil paradoxal dont l'activité cérébrale est similaire à celle de l'éveil mais pendant lequel le corps est paralysé. Ce deuxième sommeil est le principal siège des rêves qui ont souvent un fort contenu émotionnel. Bien qu'elles soient étudiées depuis plus d'une soixantaine d'années, les fonctions physiologiques, psychologiques et cognitives du sommeil paradoxal demeurent débattues dans la communauté scientifique. Une des hypothèses actuelles suggère qu'il serait un état cérébral favorable au renforcement des émotions et des souvenirs importants et pertinents pour l'individu. Dans ce contexte et pour comprendre la fonction du sommeil, ce projet vise à tester chez la souris l'hypothèse que ses effets bénéfiques sur la mémoire émotionnelle et la mémoire spatiale sont dus au recrutement du cortex rétrosplénial impliqué dans ces deux types de mémoire. Expérimentalement, des souris transgéniques seront à une semaine d'intervalle soumises à un test de mémoire spatiale puis un test d'apprentissage associatif simple. Puis pendant les 4 premières heures suivant chaque apprentissage, nous inhiberons systématiquement l'activité électrique du cortex rétrosplénial pendant chaque épisode de sommeil paradoxal post-apprentissage. Si notre hypothèse de travail est valide, l'inhibition ciblée du cortex rétrosplénial durant ces périodes devrait perturber la consolidation et la mémorisation de ces deux apprentissages.

Ce projet de recherche fondamentale requiert l'utilisation sur 3 ans de 80 souris mâles de type transgénique Gad2-ChR2-eYFP (n=40) et de deux souches transgéniques contrôles Gad2-cre (n=20) ou Flox-ChR2-eYFP (n=20). Toutes seront mises à mort en fin de procédure pour des analyses post-mortem des cerveaux.

La règle des 3R a été prise en considération :

Remplacer : Le sommeil paradoxal est un état de vigilance spécifique aux mammifères. Son étude ne peut être conduite sur des animaux de niveau phylogénétique inférieur (mouche, poisson rouge, c-elegans) parfois utilisés en recherche expérimentale. La neuroimagerie humaine, la modélisation in silico ou les cultures cellulaires ne constituent pas encore d'alternatives crédibles au modèle rongeur (ici la souris) pour l'étude de mécanismes cellulaires, synaptiques et moléculaires au sein du cerveau endormi et sous-jacents des fonctions cognitives comme la mémoire et l'apprentissage. C'est pourquoi nous profiterons des avantages que procure l'utilisation de souris de type transgénique qui, combinées aux nouveaux outils génétiques et moléculaires (ici l'ontogénétique), permettent d'atteindre in-vivo des échelles d'analyse incroyablement fines (de l'ordre de la milliseconde et du micromètre) de ces processus neurobiologiques complexes. Enfin, les réseaux neuronaux que nous ciblons sont communs aux mammifères, incluant les rongeurs et l'homme, et bien identifiés.

Réduire : La petite taille des lots de souris a été calculée au plus juste à partir de nos études antérieures utilisant les mêmes outils d'ontogénétique et/ou tests comportementaux dans le but de générer des données reproductibles dont la significativité sera validée par les tests statistiques adaptés (petits échantillons). Elle tient donc compte des « erreurs et échecs » qui peuvent survenir à chaque étape de la procédure expérimentale depuis la préparation des animaux sous anesthésie mais aussi lors des tests expérimentaux pour lesquels il est connu qu'un nombre non négligeable d'animaux ne répondent pas de manière satisfaisante, nécessitant de facto leur retrait des échantillons expérimentaux. Chaque animal ne sera soumis qu'à cette unique procédure expérimentale avec la mise à mort requise pour les analyses du cerveau, éliminant toute possibilité de réutilisation.

Raffiner : De par notre expérience d'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques, nous sommes conscients que l'étude du sommeil et de la mémoire requiert que les individus soient constamment placés dans les meilleures conditions psycho-physiologiques. Les conditions d'élevage, de soins post-opératoires, d'hébergement et les différentes étapes de la procédure expérimentale sont maîtrisées. Les expérimentations seront réalisées par des personnels compétents, formés et suivis dans leur carrière dans le cadre de leur formation continue l'expérimentation animale. Nous avons prévu des procédures appropriées de récupération de la chirurgie implantatoire sous anesthésie puis d'habituation aux conditions d'enregistrement dans le but de réduire au maximum le stress et l'inconfort. La sévérité de la procédure mise en œuvre est considérée comme modérée pendant les 5 semaines prévues d'expérimentations. Des perturbations mnésiques transitoires seront également attendues en réponse aux protocoles d'inhibition du cortex rétrosplénial, qui constituent l'essence de ce projet expérimental. Nous avons fixé des critères d'interruption des expérimentations et d'exclusion (douleur, souffrance physique et psychique, agressivité, perte de poids) estimés grâce à une grille d'évaluation quotidienne, leur impact étant manifestement délétère sur le sommeil (insomnie, fragmentation du sommeil) et sur les capacités d'apprentissage et de mémorisation.

12577 Objectif du projet :

La myéline est une substance qui gaine la plupart des fibres nerveuses. Elle agit comme un isolant électrique qui augmente l'efficacité de la conduction de l'influx nerveux. Le processus de myélinisation est indispensable au développement et au fonctionnement du système nerveux central qui intègre les fonctions sensorielles, motrices et cognitives. Les altérations de la gaine de myéline conduisent à des déficits fonctionnels sévères. Ainsi, la sclérose en plaques (SEP), qui atteint 60 000 personnes en France et représente actuellement la deuxième cause de handicap chez les jeunes adultes, est une maladie neurologique caractérisée par une démyélinisation progressive des fibres nerveuses du cerveau et de la moelle épinière. Des lésions inflammatoires disséminées se forment et entraînent une détérioration de la myéline et en conséquence un ralentissement voire un blocage de la transmission de l'influx nerveux. L'étiologie de la SEP n'est pas entièrement élucidée et on admet actuellement qu'elle est multifactorielle. Elle reste pour l'instant incurable. Même s'il existe une diminution significative de la fréquence, de la durée et de l'intensité de rechutes chez les patients traités par immunosuppresseurs et immunomodulateurs, à long terme, ces traitements sont inefficaces. Les lésions deviennent chroniques et l'atteinte des fibres nerveuses génère des handicaps irréversibles. Une des zones cérébrales fortement touchée chez les patients atteints de SEP est le corps calleux, qui comprend les fibres nerveuses qui connectent les deux hémisphères. Le corps calleux présente une perte de myéline et donc une atrophie importante chez les patients atteints de SEP.

L'objectif de ce projet est de tester l'effet de composés en développement sur la démyélinisation observée au niveau du corps calleux. Ce projet sera réalisé sur un modèle murin mimant les effets de la SEP, le modèle Cuprizone. Après une diète à la Cuprizone, les fonctions motrices des souris seront testées à l'aide de tests comportementaux passifs (rotarod et test de marche). A la fin de l'étude comportementale, les animaux seront mis à mort afin de réaliser des coupes cérébrales. Les composés à tester seront appliqués directement sur ces coupes. Nous utiliserons pour ce projet 606 souris à l'âge adulte.

Avantages :

Le modèle Cuprizone est couramment utilisé dans les études scientifiques afin d'étudier les dommages cérébraux provoqués par la SEP. Ce modèle d'étude consiste à administrer une diète à la Cuprizone à des souris pendant une durée maximale de 8 semaines. Cette diète va induire des déficits moteurs et neuronaux et ainsi mimer les symptômes humains de la sclérose en plaques. L'altération de l'influx nerveux pourra être mesurée directement par la technique d'électrophysiologie ex-vivo, sur coupes cérébrales. Les données obtenues permettront ainsi de mieux comprendre les modifications neuronales et comportementales qui sous-tendent la SEP et de tester l'effet de composés en développement sur le système nerveux.

Dommmages escomptés :

La diète entraînera des lésions préférentielles dans le corps calleux altérant la transmission de l'influx nerveux. Aucun déficit majeur n'a été répertorié pour un traitement de souris à la Cuprizone pour une période de 8 semaines. Des points limites appropriés seront définis afin de s'assurer du bien-être animal. Des fiches d'observation permettront le suivi de ces points limites et la mise en place d'intervention précoces et adaptées en cas de souffrance animale.

Remplacer : L'étude du système nerveux, par sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et ainsi aboutir au traitement de cette pathologie et au développement de nouvelles thérapies. Nos expérimentations seront réalisées chez la souris. Ces rongeurs, de petite taille et d'élevage facile, possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe. De plus, il existe un modèle animal de la SEP utilisé communément par la communauté scientifique nationale et internationale pour la recherche fondamentale et l'étude de l'effet de composés (le modèle Cuprizone).

Réduire : le nombre de souris a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

Raffiner : les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (jouets, copeaux de bois à grignoter afin de compenser la plus faible dureté des pellets contenant la Cuprizone en comparaison avec les pellets standard, contact visuel entre les animaux, musique, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum. Avant les expériences, les animaux seront acclimatés pendant une période d'au moins 5 jours. Dès que le traitement à la Cuprizone débutera, une observation journalière des animaux sera mise en place. Des points limites préalablement définis et adaptés à chaque mode d'administration permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de leur bien-être (souffrance, stress, angoisse). En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée selon les points limites définis.

12578 L'amaurose congénitale de Leber (ACL) est la dystrophie rétinienne la plus sévère et la plus précoce. Elle est responsable d'une cécité ou d'une malvoyance profonde dans les premiers mois de vie. Cette maladie est hétérogène sur le plan génétique. Récemment, nous avons identifié un gène responsable d'ACL associé à une surdité de perception, le gène TUBB4B. Notre équipe s'intéresse aux conséquences ophtalmologiques des mutations de ce gène qui code une tubuline dont le rôle dans la vision n'est absolument pas connu. Or, il est difficile de récupérer du matériel oculaire adapté (rétine) chez l'humain. Les études in vitro r alis es sur plusieurs modèles cellulaires ne suffisent pas en ce qui concerne les analyses moléculaires et surtout phénotypiques. Ce projet consiste à créer un modèle murin mimant la pathologie humaine. Pour cela la mutation du gène de tubuline sera introduite dans des ovocytes fécondés à l'aide des nouveaux outils de génétique moléculaire. Ces ovocytes génétiquement modifiés seront réimplantés chez des femelles pseudogestantes.

L'objectif de ce projet est :

1) Analyser les signes cliniques ophtalmologiques chez les souris mut es par comparaison avec des souris saines, par enregistrement de la fonction visuelle par électrorétinographie au stade 1-2-3-4-5 et 6 mois. Ces données devraient tout d'abord permettre de vérifier si le modèle murin reproduit les lésions rétiniennes de la pathologie humaine.

Si, et seulement si, l'atteinte de la fonction rétinienne est av r e :

2) Analyser plus finement les tissus oculaires (en particulier la rétine) des souris mutées versus saines en procédant à leur euthanasie au stade 0-1-2-3-4-5 et 6 mois.

Le but est de comprendre le rôle de tubb4b dans la rétine, d'appréhender la physiopathologie de cette maladie et d'obtenir un bon modèle animal permettant d'envisager des futurs protocoles thérapeutiques.

Ce projet a été développé en respectant la règle des 3R.

Remplacer : Le modèle TUBB4B est un modèle expérimental de dégénérescence rétinienne. Il n'existe pas de modèle in vitro représentatif de la dégénérescence des photorécepteurs.

Réduire : La procédure d'enregistrement de l'électrorétinogramme est standardisée sur les deux yeux afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser et obtenir des résultats statistiquement exploitables. Au total l'ensemble du projet nécessitera 157 souris sur 3 ans.

Raffiner : Le suivi clinique des animaux sera quotidien et les enregistrements de la fonction visuelle par électrorétinogramme de la nouvelle lignée murine seront réalisés sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance et éviter que les animaux bougent. Les procédures mises en place pour réaliser le projet sont peu traumatiques, de courte durée, elles peuvent néanmoins engendrer du stress, et sont donc réalisées sous anesthésie générale. Des points limites sont identifiés afin de minimiser l'inconfort, la souffrance ou la détresse potentiels des animaux et de mettre en place la conduite à tenir.

12579 Dans ce projet nous développons une formulation capable de délivrer des antigènes de mélanome sous forme d'ARN in vivo avec induction d'une réponse immunitaire spécifique et protectrice. Les formulations utilisées jusqu'ici dans l'équipe permettent l'induction d'une réponse protectrice contre le mélanome. Il y a 10 000 nouveaux cas de mélanome par an en France. Cependant, la protection observée contre la croissance de tumeurs exigeait l'administration d'une dose d'ARN élevée par rapport aux essais cliniques en cours avec des vaccins ARN contre le cancer.

Pour améliorer l'efficacité de notre formulation (désignée lipopolyplexes), nous allons tester deux adjuvants : un inhibiteur de la dégradation des ARN (siRNA), un immunogène (CpG) pour augmenter l'activation des lymphocytes T.

Dans ce projet, nous allons étudier l'influence de ces adjuvants sur :

- 1) l'expression de l'ARN dans les cellules immunitaires
- 2) l'induction de lymphocytes T spécifiques de l'antigène codé par le vaccin ARN
- 3) la protection contre le développement de tumeurs murines B16F10
- 4) la protection contre le développement de tumeurs humaines SK-MEL3
- 5) la protection contre le développement de métastases pulmonaires en utilisant des cellules tumorales B16F10-luc exprimant de façon stable la luciférase

Des études préliminaires ont permis de montrer que les lipopolyplexes ARN (LPP) avec adjuvants ne sont pas toxiques in cellulo.

Après vaccination, des tumeurs murines ou humaines seront implantées sur les souris vaccinées et nous suivrons le développement de tumeurs primaires et métastases pulmonaires.

Nous évaluerons la transfection des cellules immunitaire et l'induction de lymphocytes spécifiques contre le mélanome.

Le sang sera prélevé pour doser les lymphocytes circulants spécifiques de l'antigène codé par le vaccin ARN.

Les dommages attendus sont modérés et liés à l'implantation de tumeurs chez les souris.

Les avantages liés à ce projet sont l'évaluation de nouveaux adjuvants pour la vaccination ARN contre le cancer. Ce projet permettra d'augmenter les vaccins par ARN existants, il permettra aussi d'en diminuer les doses ce qui permettra à terme de démocratiser ce type de vaccins dont les coûts sont de nos jours compris entre 20 000 et 100 000 euros par patient.

Les animaux recevront 5 types de vaccins par voie intraveineuse sous anesthésie isoflurane (3%):

- 1) vaccin lipopolyplexes ARN
- 2) vaccin lipopolyplexes ARN + siRNA
- 3) vaccin lipopolyplexes ARN + CpG
- 4) vaccin lipopolyplexes ARN + siRNA contrôle
- 5) vaccin lipopolyplexes ARN + CpG contrôle

De plus un groupe de souris ne sera pas vacciné.

Des lots de 5 souris par groupe sont prévus pour tous les groupes. Le nombre total d'animaux est de 360 animaux.

Nos travaux seront menés dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : Nous avons déjà effectué des travaux in cellulo préalables sur des cellules dendritiques murines traitées avec des lipopolyplexes ARN + les deux adjuvants.

Nous avons pu mettre en évidence que l'incorporation des adjuvants n'induit pas de toxicité in cellulo. Les travaux chez le modèle animal demeurent nécessaires avant de passer à des tests sur l'Homme.

Réduire : L'effectif des souris mis en œuvre est limité au strict minimum permettant d'obtenir des résultats exploitables statistiquement.

Raffiner : Les animaux seront anesthésiés durant la procédure et seront surveillés quotidiennement dès leur arrivée avec une grille de scoring et recevront un analgésique en cas de douleur.

12580 L'imagerie acousto-optique est une récente méthode d'imagerie qui combine l'utilisation de l'échographie et de l'imagerie optique de la bioluminescence (BLI). Dans le cas présent l'échographie est utilisée pour marquer la lumière profondément à l'intérieur des tissus (typiquement jusqu'à 5 cm de profondeur). Ce marquage permet alors de reconstruire une carte de la couleur des tissus. Chez le patient, dans le cas du mélanome la présence de métastases hépatiques (tumeurs dans le foie) n'est pas détectable à un stade précoce par échographie. Cependant ces métastases changent de couleur au cours de leur évolution. De ce fait notre objectif est d'utiliser cette méthode d'imagerie permettant de visualiser la couleur des tissus à l'intérieur des organes pour détecter et caractériser la présence de tumeurs au sein du foie. Si cette stratégie s'avère efficace, elle pourra permettre le développement d'un protocole d'imagerie chez les patients atteints de cancer colorectal, ayant développé des métastases.

La règle des 3R a été prise en considération :

Remplacer : L'expérimentation sur les animaux n'est pas substituable pour valider les méthodes d'imagerie, car il est impossible de pouvoir simuler de manière fidèle les mouvements naturels des tissus, dus à la pulsativité et le flux sanguin ainsi que la respiration. Les approches in vivo sont le seul moyen pour l'heure de vérifier la robustesse de la technique.

Réduire : Afin de limiter le nombre d'animaux, nous avons évalué sur des biopsies, la technique d'imagerie afin de valider la preuve de ce concept. Nous utiliserons au total 100 souris sur deux modèles animaux différents. Un modèle murin de mélanome B16 exprimant fortement la mélanine (noire), modèle se rapprochant de la pathologie chez l'homme. Un modèle murin de métastases colorectales CT26 servant de tumeur contrôle non pigmentée (blanche).

Raffiner : Ces modèles seront réalisés sur des souris recevant une injection de ces deux types cellulaires dans le foie (CT26-Luc ou B16-Luc). Le suivi de la croissance tumorale sera réalisé par imagerie optique de la bioluminescence (BLI) et acousto-optique, non invasives. Pour que la souffrance des souris soit réduite au maximum, les interventions chirurgicales et les imageries seront réalisées sous anesthésie générale. De plus, des antalgiques seront systématiquement donnés après les procédures chirurgicales. Des points-limites généraux avec l'établissement d'une grille d'évaluation regroupant les critères relatifs au bien-être tout le long de l'étude ont été établis.

12581 Nous proposons de tester l'effet de peptides induisant l'autophagie (peptides pro-autophagiques) dans un contexte d'infection à Mycobacterium tuberculosis, agent étiologique de la tuberculose

humaine qui cause la mort de 1,5 millions de personnes par an. L'effet bénéfique supposé de l'induction de l'autophagie permettrait de diminuer la dose et/ou la durée du traitement des patients améliorant ainsi le pronostic d'évolution de la maladie et atténuerait les risques d'apparition de résistance aux antibiotiques des bactéries. L'autophagie est un processus physiologique permettant la dégradation des constituants cellulaires par les lysosomes. Dans le cas d'infection à *Mycobacterium tuberculosis*, l'activation de l'autophagie par différents composés pharmacologiques ou immunologiques permet de tuer, ex-vivo, la bactérie résidant dans des macrophages. L'effet de l'activation de l'autophagie dans un modèle murin d'infection à *Mycobacterium tuberculosis* reste débattu car les composés testés (carbamazépine par exemple) jusqu'à présent ne sont pas spécifiques de l'autophagie et peuvent activer d'autres processus cellulaires. Récemment, des peptides ont été élaborés afin de permettre l'activation spécifique de l'autophagie. Ces peptides ont été testés avec succès chez la souris dans un contexte d'infection virale. Le but du protocole est d'évaluer l'impact de l'induction de l'autophagie sur l'évolution de l'infection mycobactérienne dans un modèle murin. Nous disposons d'une lignée de souris transgéniques C57Bl/6 (GFP-LC3#53) qui exprime un marqueur de l'autophagie la protéine LC3 couplée à une protéine fluorescente, la GFP. En absence d'autophagie, la protéine GFP-LC3 se trouve dans le cytosol sous forme diffuse. L'activation de l'autophagie induit la lipidation de GFP-LC3 et la formation de vacuoles, les autophagosomes. La GFP-LC3 apparaît alors sous forme de puncta qui peuvent être quantifiés afin de déterminer le niveau d'autophagie. L'effet de ces peptides sera comparé à la carbamazépine qui est utilisé comme médicament anticonvulsivant et thymorégulateur mais qui est également doué de propriétés pro-autophagiques in vitro. Cependant les nombreux effets secondaires sur la sphère neuro-psychique limitent son utilisation en thérapie anti-infectieuse.

Nous envisageons de réaliser deux procédures :

Une procédure dans un contexte non-infectieux afin de déterminer la cinétique d'apparition de l'autophagie dans les poumons, choisir le meilleur peptide et définir sa dose optimale. Cette procédure est de gravité légère. En nous appuyant sur les données de la littérature, nous avons réduit au maximum le nombre de souris et, ainsi, les expériences seront réalisées sur 2 souris par condition. Cette procédure nécessitera 142 souris.

Une procédure dans un contexte infectieux afin de déterminer l'effet d'un peptide pro-autophagique sur l'évolution de l'infection des souris par *Mycobacterium tuberculosis*. Cette procédure est de gravité modérée. Nous avons limité le nombre d'animaux à 5 par lot afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'effet du peptide tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques adaptés aux petits effectifs. De plus, dans ce modèle expérimental, comme dans la plupart des modèles d'investigation in vivo, la variabilité inter individuelle en réponse à un stimulus est importante et ne nous permet pas de diminuer le nombre d'animaux par groupe en dessous de 5. Cette procédure nécessitera 65 souris.

Au total le nombre de souris nécessaire à la réalisation de ce projet est de 207 souris.

Mise en œuvre de la règle des 3R :

Remplacer : Etant donné la complexité de l'établissement et du maintien des réponses immunitaires aucune méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivants n'est susceptible de répondre aux objectifs du projet.

Réduire : le nombre d'animaux a été rationalisé à partir des données de la littérature et de résultats obtenus précédemment.

Raffiner : Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement, dans des locaux conformes à la réglementation et suivis par un personnel spécifiquement formé afin que les besoins physiologiques des animaux soient respectés. Des points limites précoces ont été définis pour éviter toute souffrance. L'état général des animaux (poil hérissé, hypo- ou hyperactivité...), la physiologie (rythme respiratoire, température corporelle), le comportement alimentaire, ainsi que la prise de poids des animaux seront suivis régulièrement. Ces différents critères permettront d'appréhender au mieux l'effet des produits testés et/ou la douleur que cette dernière pourrait engendrer.

12582 La mortalité des jeunes est un enjeu technico-économique majeur en élevage ovin. Des études ont établi que l'alimentation de la brebis, notamment en fin de gestation, joue un rôle important dans la survie de l'agneau à la naissance. Aucun de ces travaux n'étudie l'influence de l'alimentation des mères en fin de gestation sur la vigueur de l'agneau.

La vigueur de l'agneau à la naissance se définit comme sa capacité à se lever et à aller téter seul le colostrum, indispensable à sa survie. Améliorer la vigueur de l'agneau tient d'une approche agroécologique qui permet de répondre aux enjeux de la triple performance (économique, environnementale et sociale) des élevages ovins : meilleure performance économique des exploitations grâce à une Réduire de la mortalité et de la morbidité des agneaux ; Réduire des intrants (notamment médicamenteux et meilleure valorisation des ressources fourragères) ; diminution de la pénibilité du métier d'éleveur en période d'agnelage grâce à des agneaux plus autonomes et moins malades.

L'alimentation des brebis en fin de gestation est un point important de nos systèmes, avec des brebis qui peuvent être doubles (gestante de deux agneaux) ou triples (gestantes de trois agneaux). Ces brebis ont des besoins alimentaires importants en fin de gestation et une capacité d'ingestion faible du fait de l'encombrement de l'utérus, ce qui nécessite de les compléter avec des aliments à haute valeur alimentaire (céréales, tourteau d'oléagineux...). Un défaut de couverture des besoins alimentaires est courant pour ce type de brebis.

Le protocole expérimental suit 150 brebis adultes synchronisées et inséminées artificiellement. La taille de leur portée sera évaluée par échographie. Les brebis seront allotées en fonction de la taille de la portée. Les six dernières semaines de gestation, un lot recevra une ration qui couvre 100% des besoins alimentaires des brebis et l'autre lot recevra une ration qui couvre 80% de ces besoins. L'état corporel sera évalué tous les 15 jours avec une note d'état corporel (NEC). A l'agnelage, toutes les brebis seront observées et une assistance leur sera prodiguée si besoin. Pour les nouveau-nés, des mesures de vigueur sont faites par observation. Les seules interventions seront la pesée et la prise de température, qui seront faites de manière à perturber le couple mère-agneaux le moins possible. Après agnelage, les brebis recevront toutes une ration adaptée à leurs besoins. Les agneaux seront suivis (mortalité, morbidité, croissance) jusqu'à leur sevrage.

Conformité avec les exigences de Remplacer, de Réduire et de Raffiner de la règle des 3R :

Remplacer : Cette étude ne peut pas être réalisée in vitro et l'espèce ovine est l'espèce cible pour l'évaluation de l'effet du niveau de couverture des besoins alimentaires des brebis en fin de gestation sur la vigueur de leurs agneaux.

Réduction : Un calcul de puissance statistique a été fait pour réduire au minimum le nombre de brebis utilisées dans le protocole, tout en permettant d'obtenir des résultats interprétables et nous permettant de conclure sur l'évaluation de l'effet du niveau de couverture des besoins alimentaires des brebis en fin de gestation sur la vigueur de leurs agneaux.

Raffinement : Les brebis et les agneaux seront maintenus dans leurs conditions d'élevage habituelles au sein du troupeau (elles seront notamment hébergées en groupe, sur une litière paillée, case d'agnelage) et feront l'objet d'une surveillance quotidienne pendant toute la durée du protocole et d'une surveillance étroite, voire continue, pendant la période d'agnelage. Des points limites précoces généraux et en lien avec la procédure ont été définis pour éviter toute souffrance. En cas de symptôme alarmant, une intervention vétérinaire aura lieu et l'animal sera sorti du protocole si nécessaire.

12583 L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) du proton est connue pour sa limite d'application en ce qui concerne les pathologies pulmonaires en raison de la faible densité en noyau d'hydrogène et des nombreuses interfaces entre l'air et les tissus qui impliquent un très faible signal quasi-inexploitable.

Une alternative consiste à utiliser une nouvelle technique d'IRM : l'IRM du xénon polarisé. Le xénon (Xe) est un gaz rare déjà utilisé en tant qu'anesthésiant gazeux chez l'homme et son utilisation a donc été validée. C'est une technique très sensible qui permet d'obtenir des informations complémentaires à l'IRM classique. Après inhalation d'Xe gaz par l'animal à travers un masque,

des images sont alors réalisées au niveau des poumons. Cette technique peut s'avérer être un outil visuel et direct de diagnostic des maladies pulmonaires les plus développées, parmi lesquelles : l'asthme, la fibrose kystique (mucoviscidose), et la broncho-pneumopathie chronique obstructive, abrégée BPCO ou dite COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease). De plus, il est possible d'associer le xénon à des molécules qui permettront d'adresser le signal xénon à une cible biologique spécifique (par exemple, cibler des marqueurs du cancer). En choisissant bien les biosondes il est possible d'en détecter plusieurs simultanément lors d'une même acquisition. L'intérêt majeur de cette technique est que la molécule n'a besoin d'être injectée qu'une seule fois dans l'organisme, le suivi au cours du temps se faisant en faisant inhaler du Xe ; ce qui réduit considérablement l'éventuelle toxicité de la méthode. Cette preuve de concept n'a cependant jamais été réalisée in vivo.

Le but de ce projet est de montrer la faisabilité de telles expériences sur des animaux sains en associant de l'IRM haut champ avec un montage permettant de délivrer du xénon polarisé. Il se divisera en deux grandes parties : 1) l'optimisation de la méthodologie pour pouvoir obtenir des images ^{129}Xe des poumons de souris. 2) détection de deux biosondes modèles préalablement administrées par instillation nasale dans les poumons de souris par IRM du ^{129}Xe polarisé. Dans ce projet, 20 souris seront utilisées.

La règle des 3R a été prise en considération :

Remplacer : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude préclinique ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Réduire : le nombre d'animaux utilisés et le nombre d'expériences seront réduits au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles. L'intérêt de l'IRM réside aussi dans le fait qu'une même souris peut être observée plusieurs fois dans le temps et donc d'utiliser moins d'animaux.

Raffiner : les animaux sont observés scrupuleusement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. Il s'agit de procédures courtes et sans réveil au cours desquelles les animaux seront anesthésiés pour l'imagerie et les administrations nasales et euthanasiés à la fin avant leur réveil.. Des points limites précoces ont été définis pour éviter toute souffrance tout au long de leur vie.

12584 Actuellement, les biotechnologies de la reproduction et de l'embryon sont utilisées par les entreprises de sélection bovines afin d'accroître le nombre de descendants produits par accouplement des reproducteurs mâles et femelles les plus intéressants d'un point de vue génétique. Cette stratégie permet ainsi une augmentation plus rapide du progrès génétique selon les critères de sélection actuels et en lien avec les demandes sociétales. En théorie, l'approche la plus efficace consiste à produire des embryons in vitro à partir des gamètes des meilleurs reproducteurs, à prélever quelques cellules par biopsie (pour estimation de leur potentiel génétique) et à les congeler pour ne transférer que les plus intéressants dans des femelles receveuses de niveau génétique moindre. Toutefois, les taux de gestation plus faibles obtenus dans ce cas (de l'ordre de 35 %) induisent un coût trop important, limitant de fait l'essor de cette approche et le progrès génétique réalisable annuellement. Ces mauvais résultats sont imputables à la moindre qualité des embryons produits in vitro par rapport à ceux produits in vivo entraînant notamment une plus faible résistance à la congélation. L'objectif de ce projet consiste à produire, à partir des mêmes femelles donneuses, des embryons in vivo et in vitro pour analyser leurs différences en termes de composition lipidique et ainsi envisager des stratégies correctives. Pour les besoins expérimentaux, huit génisses seront recrutées pour produire 100 à 150 embryons in vivo et 100 à 150 embryons in vitro. Compte-tenu de la variabilité de réponse des femelles donneuses, il est difficile d'établir avec certitude le nombre de sessions de production in vivo (procédure 1) et in vitro (procédure 2) qui seront nécessaires pour répondre aux objectifs fixés (on peut cependant estimer les besoins à 3 sessions in vivo et 6 sessions in vitro par femelle donneuse). Des prises de sang (procédure 3) seront également réalisées deux jours avant les sessions de production afin d'être en mesure d'évaluer le statut métabolique des animaux ou de réaliser des analyses complémentaires.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacer : aucun modèle ex vivo ne permet à ce jour de produire le matériel biologique nécessaire au projet de recherche.

Réduire : compte-tenu des besoins en matériel biologique, le protocole expérimental adopté permet de réduire le nombre d'individus utilisés en répétant, de façon raisonnée, les procédures expérimentales sur les mêmes individus.

Raffiner : Une anesthésie épidurale et une légère sédation systématiquement pratiquées lors des procédures de collectes d'ovocytes (accompagnée d'une légère sédation) et d'embryons permettent d'éviter toute souffrance. De ce fait, l'ensemble des procédures expérimentales utilisées dans le cadre de ce projet, semblables aux techniques utilisées en élevage dans le cadre des activités de transfert embryonnaire sont de classe modérée et légère. De plus, les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance quotidienne (activité, comportement) et hébergées dans une stabulation répondant aux normes de bien-être animal chez cette espèce (10m² par animal avec un accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, présence de tapis caoutchouc derrière pour le confort des aplombs, accès à des brosses latérales et dorsales...).

12585 Le cancer pancréatique est un des cancers les plus agressifs. Le taux de survie globale à 5 ans est inférieur à 5%, et la médiane de survie globale est de 6 mois. Ce mauvais pronostic s'explique en partie par notre incapacité à diagnostiquer ce cancer à un stade suffisamment précoce mais également au faible taux de réponse des traitements en vigueur. En effet, les traitements les plus efficaces, qui ne sont disponibles que pour une fraction des patients due à leurs forts effets secondaires, montrent soit des patients complètement résistants soit des patients qui vont développer des phénomènes d'échappement thérapeutique (taux de survie à 5 ans de 20%). L'ensemble des thérapies actuelles se focalisant sur les cellules tumorales, un large champ de recherche s'est alors intéressé au contexte cellulaire tout particulier de ces tumeurs, son implication dans la résistance aux traitements et son ciblage potentiel en thérapie combinée avec les drogues déjà existantes. En effet, si la grande majorité des études s'est penchée sur le comportement des cellules tumorales, ce n'est que très récemment qu'un potentiel rôle du microenvironnement a été suggéré. Le microenvironnement ou stroma est constitué de plusieurs types cellulaires non tumoraux tels que les cellules immunitaires ou les fibroblastes. Or, il se trouve que dans la plupart des tumeurs solides (prostate, sein) il est dorénavant admis que ce microenvironnement participe au développement de la tumorigénèse. Dans le cas des tumeurs pancréatiques ce microenvironnement constitue près de 80% de la masse tumorale. Notre équipe a par ailleurs démontré le rôle prépondérant du dialogue intercellulaire entre le stroma et les cellules tumorales dans l'agressivité des tumeurs pancréatiques. Néanmoins, les modifications de prise en charge des patients tendent actuellement vers un traitement systématique des patients (néo-adjuvant, d'induction ou post-opératoire) avec les chimiothérapies les plus efficaces.

Nos résultats préliminaires suggèrent que le dialogue stroma-cellules tumorales, médiés par les vésicules extracellulaires, induit la chimiorésistance des cellules tumorales. Afin de valider ces résultats nous désirons passer à des études in vivo, grâce à deux modèles souris différents (des souris transgéniques développant de manière spontanée des cancers du pancréas et des souris immunodéficientes). Pour ce faire, nous allons combiner dans cette étude 4 protocoles différents permettant d'analyser, en utilisant un total de 155 souris (plus 300 souris issues des accouplements des modèles à phénotypes dommageables et non utilisés dans les procédures), l'implication des vésicules extracellulaires stromales dans la résistance à la chimiothérapie. Nos protocoles utiliseront comme chimiothérapie le Folfirinox qui représente actuellement la combinaison de traitement la plus efficace et la plus répandue pour le traitement du cancer du pancréas chez l'homme. En suivant la qualité de réponse au Folfirinox et la survie des animaux grâce à ces quatre protocoles, nous pourrions valider l'effet du stroma dans les phénomènes de chimiorésistance et ainsi proposer, en accord avec nos données in vitro, le ciblage du dialogue intercellulaire dans le but de potentialiser les taux de réponse et les phénomènes d'échappement à la chimiothérapie.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacer : Ce projet étudiera au sein d'un organisme entier la réponse au traitement et l'évolution d'une tumeur dans le temps, nécessitant l'utilisation d'animaux vivants.

Réduire : Le nombre d'animaux a été calculé par des tests statistiques permettant de réduire à minima le nombre d'animaux utilisés par ces procédures.

Raffiner : Nous avons, pour l'ensemble de ces procédures, mis en place un suivi journalier des animaux, une prise en charge spécifique de la douleur lors des chirurgies et en suivi post-chirurgical mais également lors du suivi quotidien des souris si nécessaires, en définissant des points limites suffisamment précoces pour éviter toute souffrance. De plus, un enrichissement renouvelé toutes les semaines incluant 3 enrichissements différents sur des cycle de trois semaines est en place dans l'animalerie (Twister en papier, cylindres en coton et nid en papier)

12586 Les microhémorragies cérébrales (MHC) sont des dépôts punctiformes d'hémosidérine présents à proximité des petits vaisseaux cérébraux. La prévalence des MHC serait de 5% chez les jeunes adultes sains, augmenterait avec l'âge, de 24 à 56% chez les patients âgés et de 24 à 48% chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA). Des études cliniques dans la population générale ont montré que les MHC pourraient être associées à un déclin cognitif. Les mécanismes par lesquels les MHC pourraient altérer les fonctions cognitives sont à ce jour non élucidés. Il a été montré sur un modèle animal de microhémorragie cérébrale que ces microhémorragies induisaient dans les semaines qui suivaient leur induction des troubles cognitifs significatifs et des modifications du métabolisme cérébral chez les souris testées. La sévérité des lésions au plan cognitif diffèrait selon le sexe, et un traitement par statine, molécule souvent prescrite chez l'homme pour réduire le risque cardiovasculaire, pouvait limiter cet impact.

L'objectif de cette étude est de comprendre sur ce modèle expérimental, sur des souris mâles et femelles, les mécanismes impliqués dans les effets cognitifs induits par la MHC et ceux de l'impact pharmacologique d'un traitement par atorvastatine. Les résultats attendus sur ce modèle vont permettre une meilleure connaissance du rôle des MHC dans les troubles cognitifs, des mécanismes impliqués et des pistes pharmacologiques possibles avec l'optique de pouvoir vérifier ensuite en clinique ces résultats et permettre une meilleure prise en charge des patients.

Dans ce projet, nous constituerons 6 groupes de souris (sauvages sham mâles, sauvages sham femelles, microhémorragies mâles, microhémorragies femelles, microhémorragies et atorvastatine mâles, microhémorragies et atorvastatine femelles). Trois temps d'évaluation en aveugle seront réalisés après induction de la microhémorragie : 24 h, 6 semaines et 6 mois. La caractérisation des mécanismes impliqués se fera par différentes techniques : immunohistochimie (marquage de l'inflammation, des neurones et de la densité synaptique), western blot (marquage de certaines protéines de survie neuronale), électrophysiologie (étude de la transmission de signal entre les neurones), PCR (quantification de l'expression des récepteurs aux œstrogènes), radio-immunologie (dosage de l'œstradiol) et IRM (estimation de la perméabilité membranaire des microvaisseaux cérébraux).

La règle des 3R a été prise en considération :

Remplacer Vu les objectifs de l'étude initiale, notamment l'aspect fonctionnel qui ne peut être objectivé que sur modèle animal, le Remplacer du modèle par des méthodes substitutives n'apparaît pas réalisable.

Réduire : Une partie des cerveaux sur lesquels les données seront obtenues provient de l'étude comportementale réalisée sur ce modèle pendant les trois années précédentes (Réduire avec la mise en œuvre d'une banque d'organes pour mutualiser les échantillons) et l'autre, de souris qui seront opérées pour compléter les groupes, en tenant compte du suivi sur 6 mois : en fonction des mécanismes étudiés, et des impératifs techniques inhérents à l'étude de ces mécanismes, cela représente un total de 450 souris (225 mâles et 225 femelles), soit 75 souris par groupe sur les trois ans à venir, permettant un nombre d'animaux minimum pour une interprétation statistique des résultats

Raffiner La procédure d'induction de la microhémorragie est réalisée sous contrôle analgésique et anesthésique et un suivi quotidien des animaux sera réalisé pour surveiller l'apparition éventuelle

de points limites, qui justifierait des mesures adaptées (analgésie, euthanasie) Par ailleurs, les animaux sont stabulés dans une zone contrôlée en température et humidité et cycles jour/ nuit, au maximum à 5 par cage, avec enrichissement de milieu.

12587 De nombreux perturbateurs endocriniens sont présents dans notre environnement. Il s'agit aussi bien de substances naturelles que de produits de synthèse, qui interfèrent avec le système hormonal. Plus précisément, des données contradictoires ont été publiées, qui laissent craindre qu'une exposition chronique à de faibles doses de certaines de ces molécules mette en danger le développement cérébral des embryons humains. Le risque que nous cherchons à évaluer est celui d'une interférence avec le fonctionnement de l'hormone thyroïdienne, l'hypothèse la plus souvent avancée pour expliquer cette toxicité neurologique. On sait en effet que cette hormone joue un rôle important dans le développement cérébral et qu'un déficit en hormone conduit à des déficiences intellectuelles. Ce projet vise à évaluer l'effet, sur le développement du cerveau, de plusieurs molécules identifiées comme ayant un effet de perturbateur thyroïdien in vitro.

Ce projet consiste à étudier la signalisation thyroïdienne dans le cerveau de souriceaux exposés à des molécules pendant la gestation et le développement postnatal. Une molécule connue pour altérer la signalisation thyroïdienne sera également administrée comme témoin positif. Les molécules seront administrées par l'eau de boisson, à faible dose pour mimer les conditions d'exposition chez l'homme. Les molécules testées dans ce projet auront toutes été identifiées au préalable comme perturbant la signalisation thyroïdienne de cellules en culture.

La règle des 3R a été prise en considération :

Remplacer : Les tests in vitro ne permettent pas de prédire avec certitude l'influence d'une exposition in vivo : ils ne prennent pas en compte le métabolisme hépatique, qui génère des composés dérivés parfois plus toxiques que le composé d'origine, et n'intègrent pas la biodisponibilité des molécules (catabolisme, élimination par les reins, stockage dans les adipocytes, passage à travers la barrière placentaire, passage à travers la barrière hémato-méningée, etc.). De plus, le développement du cerveau n'est actuellement pas encore modélisable in vitro. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser des animaux pour évaluer les effets sur la signalisation thyroïdienne au cours du développement du cerveau.

Réduire : Ce projet nécessitera l'utilisation de 1460 souris au maximum. Ce nombre prévoit des animaux supplémentaires en cas de problème. De plus, il se base sur le test de 4 molécules, mais il est possible que le nombre de molécules testées réellement in vivo soit inférieur, en fonction des résultats des tests in vitro en cours. Le nombre d'animaux a été fixé conformément aux recommandations pour les études de toxicologie : étude de petits issus de 10 portées différentes pour chaque condition. Les analyses seront réalisées sur 4 petits par portée (idéalement deux mâles et deux femelles).

Raffiner : Les doses administrées seront toutes inférieures aux doses connues pour avoir des effets toxiques. Les souris seront examinées avec soin tout au long de l'administration des molécules testées et au minimum tous les 3 jours, jusqu'à la fin de l'expérience, avec pesée des femelles adultes à chaque visite. Les souriceaux seront pesés à l'âge de 4, 7 et 14 jours. Si un animal atteint un des points limites définis, sa surveillance sera réalisée quotidiennement. Nous nous attendons à ce que les traitements administrés n'engendrent pas d'effet toxique aigu, mais plutôt des effets subtils sur le développement du cerveau, sans effet sur le bien-être animal. Des points limites adaptés ont néanmoins été définis de façon à éviter toute souffrance. En fin de procédure, les souris seront anesthésiées pour éviter toute douleur liée au prélèvement sanguin qui sera réalisé pour doser les taux d'hormones thyroïdiennes circulantes.

12588 De récentes études épidémiologiques ont mis en évidence que l'apport des Français en acide gras polyinsaturés omega-3 (AGPI n-3), et notamment leur précurseur principal, l'acide alpha-linolénique (ALA), est largement inférieur aux recommandations. Or, l'ALA joue un rôle physiologique important et serait impliqué dans la prévention de certaines pathologies neurologiques, métaboliques et inflammatoires. Dans un contexte où le risque d'obésité constitue un réel problème de santé publique, augmenter l'apport en ALA sans pour autant modifier l'apport en lipides, dont le niveau

est suffisant, représente une stratégie nutritionnelle d'un grand intérêt. Il est donc crucial de mener des recherches pour proposer de nouveaux ingrédients lipidiques qui améliorent l'absorption et la biodisponibilité de l'ALA.

Les lipides alimentaires se présentent sous plusieurs formes : ils sont principalement apportés sous forme de triglycérides (TAG), mais peuvent également être présents sous forme de phospholipides (PL), comme c'est le cas dans les lécithines végétales. Une amélioration de la biodisponibilité des AGPI n-3 à longue chaîne des huiles de poissons (DHA et EPA) sous forme de PL comparativement aux TAG a été démontrée dans des études menées sur modèle animal et sur l'Homme. Les lécithines végétales, en tant que mélanges complexes de PL et émulsifiants couramment utilisés par l'industrie agro-alimentaire, présenteraient donc un énorme potentiel dans l'amélioration de la biodisponibilité de l'ALA. Or, les lécithines végétales, à ce jour, proviennent majoritairement de la culture de soja dont les répercussions écologiques, environnementales et socio-économiques sont graves. Il devient alors primordial d'explorer des sources alternatives et bio-responsables de lécithines végétales. La lécithine de colza, produite majoritairement en France, pourrait présenter des propriétés nutritionnelles et anti-inflammatoires prometteuses. Elle constitue par ailleurs une source importante d'ALA sous forme de PL. C'est pourquoi ce projet a pour objectif d'évaluer le potentiel de la lécithine de colza en tant que nouveau vecteur alimentaire d'ALA, en fonction de sa dose et en comparaison à la lécithine de soja ou à une huile sans lécithine.

Dans le contexte nutritionnel actuel, l'étude de l'effet des lipides alimentaires, et notamment de l'ALA, doit désormais prendre en compte leur impact sur des acteurs majeurs des troubles métaboliques liés à l'obésité, c'est-à-dire l'inflammation métabolique à bas bruit, ainsi que le microbiote intestinal. Ces effets seraient en effet largement variables selon la quantité et la qualité des lipides ingérés.

Notre objectif est ainsi de montrer que l'ajout de lécithine de colza à une huile améliorerait la biodisponibilité de l'ALA, permettant ainsi de réduire les paramètres métaboliques et inflammatoires délétères engendrés par un régime hyperlipidique représentatif d'un régime occidental actuel.

Afin de répondre à ces questions, une étude de régime de 8 semaines sera réalisée chez la souris. 72 souris mâles SWISS seront réparties en 6 groupes et recevront différents régimes alimentaires : un régime témoin d'entretien, un régime hyperlipidique contrôle (non enrichi en ALA), et quatre régimes hyperlipidiques enrichis en ALA où ce dernier sera apporté uniquement sous forme de TAG (huile sans lécithine), ou également sous forme de PL à travers l'ajout de lécithines de colza à des doses réglementaires (1% et 10%) ou de lécithine de soja à 10% (lécithine de référence actuelle).

Des tests de tolérance au glucose seront effectués après 6 semaines de régime afin de mesurer la glycémie, paramètre majeur impliqué dans les désordres métaboliques. Les souris seront euthanasiées après les 8 semaines de régime. Des prélèvements de sang et de tissus seront également effectués pour analyses (biodisponibilité de l'ALA et impact métabolique et inflammatoire). Le microbiote fécal sera également analysé.

Ce projet est conforme à la règle des 3R.

Remplacer : Nos études préliminaires ont utilisé des cultures cellulaires et des modèles de digestion in vitro. Les mécanismes métaboliques et inflammatoires dans l'organisme sont complexes et impliquent de nombreuses voies de signalisation et de régulation, qu'il n'est pas possible d'étudier par des méthodes in vitro, rendant l'utilisation d'animaux indispensable dans ce projet.

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire à cette étude a été calculé au plus juste afin d'obtenir la puissance statistique maximum. Afin d'exploiter au maximum cette étude, une biobanque d'échantillons biologiques recueillis sera réalisée pour d'éventuelles analyses supplémentaires permettant de répondre à de nouvelles problématiques et ainsi limiter l'utilisation ultérieure d'animaux supplémentaires.

Raffiner : Pour leur bien-être, leur comportement social sera stimulé par une stabulation collective (6 souris / cage) dans un environnement adapté et enrichi. Des régimes tests ont été établis de façon à couvrir la totalité des besoins nutritionnels des animaux. En plus de l'observation quotidienne, une surveillance régulière (deux fois par semaine) de leur prise alimentaire et de leur

poids sera mise en place. L'établissement de ce projet in vivo et les doses de lécithines choisies sont en adéquation avec la législation sur les doses autorisées dans l'alimentation quotidienne.

12589 Le mode de vie et notamment les interactions avec les autres congénères peuvent générer un stress social qui a un impact sur la santé et la longévité des individus. Par exemple, il a été montré qu'une augmentation du stress social pouvait être corrélée à une augmentation de l'érosion des télomères. Les télomères sont des séquences répétées situées à l'extrémité des chromosomes qui protègent leur intégrité lors des divisions cellulaires, et les télomères sont impliqués dans les processus de mort cellulaire et de vieillissement. Cependant, la plupart des études sont corrélatives et il est nécessaire de développer des approches expérimentales pour identifier les facteurs responsables des corrélations observées. De plus, peu d'études s'intéressent aux mécanismes physiologiques qui peuvent expliquer le lien entre stress social et érosion des télomères. Il paraît pertinent d'étudier le rôle du stress oxydant car plusieurs études ont montré qu'un environnement social stressant peut avoir des conséquences sur le statut oxydant des individus y étant soumis. Le stress oxydant est identifié comme un des mécanismes principaux du vieillissement et de la sénescence des individus, notamment à travers les dommages qu'il peut causer à différents compartiments biologiques (lipides, protéines, ADN). Le stress oxydant se définit autour d'une balance, et a lieu lorsque les dommages oxydants imposés à l'organisme surpassent les défenses antioxydantes de ce dernier. Les défenses antioxydantes de l'organisme sont de deux natures : endogènes (notamment enzymatiques) et exogènes (issues de l'alimentation). Ainsi, le statut antioxydant des organismes change activement en fonction de l'accès à des ressources alimentaires particulières (pauvres ou riches en antioxydants). De plus, les effets du stress social sur le statut antioxydant et l'érosion des télomères sont probablement influencés par l'augmentation des hormones glucocorticoïdes (hormone de stress) en situation de stress.

Dans ce contexte, notre objectif est de comprendre les mécanismes par lesquels un environnement social stressant influence la santé et la longévité des individus en étudiant l'effet sur l'érosion des télomères, les hormones de stress et le stress oxydant. Par ailleurs, comme les défenses antioxydantes peuvent être acquises dans l'alimentation, les individus pourraient limiter les effets du stress social en se nourrissant activement sur des sources alimentaires riches en antioxydant (une forme d'automédication). Nous allons donc également manipuler les sources d'aliments et observer le comportement de choix alimentaire pendant cette expérience. Enfin, les effets du stress peuvent être trans-générationnels via des effets épigénétiques ou maternels. Notamment, les femelles qui se reproduisent dans un environnement stressant peuvent transmettre plus d'hormone de stress aux embryons ce qui affectent leur développement. Nous allons suivre les jeunes pour mieux évaluer ces effets trans-générationnels.

Les effets du stress social sont particulièrement étudiés dans les sociétés humaines, mais ils ont aussi été montrés chez d'autres animaux. Pour ce projet nous allons utiliser des oiseaux, les diamants mandarins (*Taeniopygia guttata*). Ces oiseaux sont un modèle pertinent car ils vivent en colonie de densité variable et ont beaucoup d'interactions sociales. De plus, ce sont des oiseaux granivores qui ont accès dans leur environnement à une diversité de graines dont la teneur en antioxydants est très variable.

Ce projet sera réalisé en accord avec la règle des 3R.

Remplacer : Les expériences sur l'effet du stress social ne peuvent être réalisées que chez l'animal vivant).

Réduire : Nous allons utiliser 32 oiseaux adultes par réplicat (2 réplicats, soit 64 oiseaux adultes) ainsi que les jeunes produits pendant la reproduction (environ 100 jeunes). La taille d'échantillon a été déterminée en fonction de la biologie de l'espèce (espèce vivant en groupe) et aussi pour réduire le nombre d'animaux utilisés tout en ayant une puissance de test statistique satisfaisante

Raffiner : Pour l'enrichissement des cages, nous utilisons des perchoirs et branchages et également des bassines dans lesquelles les oiseaux peuvent se baigner. De plus, le stress des animaux sera réduit en limitant les dérangements au strict minimum (les oiseaux restent dans leur cage, observation par vidéo et enregistrements de QR codes). Lors des prises de sang on couvre la tête

de l'oiseau de façon à masquer les yeux, ce qui a pour effet de le tranquilliser. Des points limites précoces ont été définis pour éviter toute souffrance.

12590 Le diabète de type 2 (DT2) est reconnu comme un état inflammatoire de bas grade. L'inflammation exerce des effets délétères aussi bien au niveau pancréatique, en altérant la fonctionnalité et la survie des îlots de Langerhans, mais aussi au niveau des tissus cibles de l'insuline. Elle serait un mécanisme clef dans la pathogenèse du DT2. A ce titre, des approches pharmacologiques à visée anti-inflammatoires devraient progressivement trouver leur place dans la prévention et le traitement du DT2.

Notre étude portera sur l'enzyme Glycogène Synthase Kinase 3 Beta (GSK3 Beta), qui joue un rôle important dans les processus inflammatoires et notre objectif sera d'évaluer, in vivo, les effets anti-inflammatoires et pro régénératifs de l'inhibition de cette enzyme par des inhibiteurs spécifiques tels que le chlorure de Lithium (LiCl) et des oligonucléotides anti sens dirigés contre GSK3 Beta dans un modèle de diabète type 1 la souris NOD (Non Obese Diabetic) et un modèle de diabète de type 2 le rat GK.

Nous étudierons aussi, in vivo, les potentiels effets bénéfiques de cette inhibition de GSK3 Beta sur la survie d'îlots de Langerhans, humains ou de rongeurs, greffés en intramusculaire chez des animaux, rat Lewis et souris Nude, présentant un diabète.

Ce projet novateur devrait nous permettre de définir le rôle de GSK3 Beta dans l'inflammation insulaire et d'évaluer son potentiel, comme cible thérapeutique pour des approches pharmacologiques à visée anti-inflammatoire pour la prévention et/ou le traitement des diabètes.

Ce projet est prévu sur 5 années, durant lesquelles nous utiliserons 512 animaux :

- Pour l'étude in vivo sur les effets des inhibiteurs de GSK3 Beta 56 rats mâles GK (diabète de type 2), 56 rats mâles Wistar (non diabétiques), 240 souris NOD (diabète de type 1),
- Pour l'étude in vivo sur la survie de greffons d'îlots de Langerhans de rongeurs ou humains, 80 rats mâles Lewis receveurs de greffes d'îlots de rongeurs et 80 souris immunodéficiences Nude receveuses de greffes d'îlots humains.

Ce projet sera réalisé en accord avec la règle des 3R.

Remplacer : Cette étude ne peut être envisagée qu'à partir de modèles animaux, seuls capables de nous permettre d'analyser, in vivo, l'évolution des phénomènes structurels et fonctionnels du pancréas endocrine sous l'effet de ces traitements par les inhibiteurs de GSK3 Beta.

Réduire : Nous utiliserons un nombre d'animaux réduit, mais de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables et valides.

Raffiner : L'ensemble des procédures de ce projet vise à concilier le respect du bien-être animal avec une interprétation fiable. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation.

Un enrichissement constitué de nid végétal sera apporté dans la phase postopératoire et des mesures seront prises pour réduire la douleur pendant la chirurgie et la période post opératoire (anesthésie, analgésie).

Nous veillerons pour les animaux diabétiques aux points limites comme la perte hydrique et alimentaire, en renouvelant l'eau de boisson tous les deux jours et en suivant le poids des animaux chaque semaine. Les litières seront aussi renouvelées tous les deux jours pour ces animaux. Les comportements modifiés seront aussi surveillés .

12591 L'importance des communications entre organes en physiopathologie ne fait aujourd'hui aucun doute. Pour autant, les mécanismes d'interaction entre le squelette et d'autres organes comme le cerveau, le rein ou les tissus adipeux sont loin d'être complètement élucidés. Notre but est de mieux comprendre ces mécanismes en portant une attention particulière sur le rôle des protéines PiT/SLC20A.

PiT1/Slc20a1 et PiT2/Slc20a2 sont des transporteurs de phosphate (Pi) présents à la surface de la plupart des cellules de mammifères. Nos travaux montrent que PiT2 est une protéine qui joue un rôle important pour la croissance et la minéralisation du squelette sans pour autant agir directement

sur les cellules qui constituent cet organe. Nos résultats suggèrent que des défauts de communication entre le squelette et d'autres organes pourraient influencer sur la physiologie du squelette. L'évaluation de cette hypothèse ne peut se faire qu'en utilisant l'organisme entier. Pour répondre en partie à cette hypothèse, nous analyserons le phénotype de différents organes, comme le cerveau et le rein des souris invalidées totalement pour le gène *Slc20a2* (Souris PiT2KO) ou invalidées spécifiquement dans le squelette pour le gène *Slc20a1* (souris PiT1cKO).

Ces analyses phénotypiques prennent en compte la règle des 3R

Remplacer : L'ensemble de cette étude vise à comprendre l'implication des protéines PiT dans la physiopathologie du squelette et sa communication avec d'autres organes. Il n'existe donc pas de méthode alternative à l'utilisation de l'animal pour ce projet.

Réduire : Les analyses seront donc réalisées sur un nombre d'animaux par groupe correspondant au nombre minimal requis pour chaque type de test afin d'atteindre une significativité statistique (soit 10 animaux par groupe). L'étude du phénotype des souris PiT2KO et PiT1cKO nécessitera 80 souris sur 2 ans.

Raffiner : Les animaux sont profondément endormis et recevoir une dose d'antidouleur avant de commencer la procédure. Leur état de santé et de bien-être est t surveillé quotidiennement, des points limites précoces ont été définis pour éviter toute souffrance.

12592 Les accidents survenant au niveau d'une centrale nucléaire ont pour conséquence principale le rejet dans l'environnement de fortes quantités de radioactivité sous forme de particules et gaz radioactifs pouvant contaminer les populations exposées. Parmi les isotopes présents dans les rejets, figurent notamment l'iode 131 et d'autres isotopes à vie courte de l'iode. L'exposition des populations aux iodes radioactifs est notamment associée à une augmentation de cancers de la thyroïde. Les conséquences sanitaires liées à l'exposition aux iodes radioactifs peuvent néanmoins être limitées par l'ingestion de comprimés d'iode stable. Idéalement, cette administration doit intervenir deux heures avant l'exposition au panache radioactif. Cette mesure préventive est efficace en cas d'exposition ponctuelle comme lors du passage d'un nuage radioactif. Toutefois, lors de la récente catastrophe de Fukushima Dai-ichi, les autorités sanitaires ont été confrontées à un relargage répété d'iode radioactif et, dans le cas d'une exposition répétée, une prise d'iode stable unique en prophylaxie n'est pas appropriée. En raison du déficit de connaissances quant aux modalités d'administrations répétées d'iode stable pour assurer une protection efficace, les autorités sont en fait démunies face à des situations de rejets chroniques d'iodes radioactifs. De plus, les effets secondaires engendrés par ces administrations réitérées sont mal connus mais une surcharge continue en iode est certainement à éviter. Pour établir une procédure de prophylaxie adaptée, nous avons mené un projet de recherche qui nous a permis de déterminer les modalités d'administrations répétées d'iode stable en situation de rejets radioactifs chroniques afin de faire évoluer l'actuelle autorisation de mise sur le marché des comprimés d'iodure de potassium (KI). Cette étude portait sur des rats adultes. Cependant, l'ensemble de la population susceptible d'être exposée aux rejets radioactifs devrait bénéficier d'une telle mesure de protection, en veillant à protéger les femmes enceintes (protection du fœtus) et les jeunes de moins de 18 ans. Pour cela, notre équipe va plus spécifiquement s'intéresser aux effets protecteurs d'une administration répétée d'iode stable sur la thyroïde des rates gestantes et de leurs embryons ainsi que l'effet sur l'activité thyroïdienne des jeunes animaux dont la mère a reçu une administration répétée d'iode stable durant la gestation. Pour réaliser cette étude, nous planifions d'utiliser 120 rates gestantes, 1260 embryons et 540 rats pour des expériences d'imagerie isotopique (soit 1920 animaux). Les animaux seront suivis par des techniques d'imagerie isotopique in vivo puis sacrifiés.

Ce projet sera réalisé en accord avec la règle des 3R.

Remplacer : des études in vitro ne sont pas possible à cause de la complexité des systèmes biologiques étudiés.

Réduire : le nombre d'animaux a été choisi en suivant un modèle de calcul statistique permettant de définir le nombre de rats suffisant pour l'obtention de résultats significatifs.

Raffiner : l'utilisation de la technique d'imagerie isotopique non invasive SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) permet de suivre in vivo des cellules accumulant de l'iode. La capacité d'accumulation d'iodure est mesurée avec du ^{99m}Tc-pertechnétate non métabolisé dans les hormones thyroïdiennes. L'iode 123 est utilisé pour la quantification de l'accumulation et de l'organification de l'iodure dans les hormones. Elle permet également d'effectuer plusieurs enregistrements répétés sur un même animal et ainsi diminuer considérablement le nombre d'animaux nécessaires. De plus, les animaux seront hébergés dans une zone spécifique agréée. Ils évolueront dans un environnement adapté à leur espèce. Des cages de surface réglementaire avec nourriture et eau ad libitum, maisons et morceaux de bois pour nidification seront utilisées.

Durant les expériences d'imagerie, les animaux sont anesthésiés dans un environnement contrôlé. Un système de contrôle de ventilation pulmonaire sera utilisé pour surveiller continuellement l'état de l'animal durant la phase d'anesthésie. Les animaux seront suivis tout au long du protocole. De la phase d'acclimatation, à la phase d'expérimentation puis post-expérimentation. Des fiches de suivi ont été établies sur les conseils de la Structure du Bien-Etre Animal du site. Des points limites ont été établis spécifiquement pour cette expérimentation qui permettront d'assurer au mieux le bien-être de l'animal afin d'éviter toute souffrance inutile. Toutes ces expérimentations seront réalisées par un personnel formé et qualifié pour les techniques utilisées.

12593 Le glioblastome multiforme (GBM) ou astrocytomes de grade IV est la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente et la plus agressive. Le pronostic du GBM est très défavorable avec un taux de survie à 5 ans ne dépassant pas 5% malgré un traitement agressif combinant radio-et chimiothérapie. Ainsi le développement de nouvelles stratégies est indispensable. L'immunothérapie par transfert adoptif d'effecteurs immunitaires cytotoxiques représente une stratégie d'intérêt afin de cibler les cellules tumorales infiltrantes et/ou radio-chimio-résistantes, principales causes de récurrences de la maladie. Ce projet vise donc à évaluer, à l'aide de modèles in vivo, le potentiel thérapeutique de différents effecteurs immunitaires en combinaison au traitement standard, administrés aux patients atteints de GBM.

Pour cela, des souris immunodéficientes NOD-SCID-IL-2Rg (NSG ; NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) seront utilisées afin de réaliser des greffes de cellules humaines (cellules tumorales et cellules immunitaires). Après implantation de cellules tumorales primaires de GBM en orthotopique, ces souris recevront le traitement standard des patients qui combine radio-et chimiothérapie suivi d'injections intratumorales d'effecteurs cytotoxiques. Plusieurs populations lymphocytaires pourront être utilisées telles que des lymphocytes T (LT) spécifique d'un antigène de tumeur ou modifiés génétiquement pour exprimer un récepteur leur conférant une activité d'ADCC (antibody dependent cell cytotoxicité). Des LT non-conventionnels de type V γ 9V δ 2 pourront également être utilisés, seuls ou combinés à une molécule activatrice (ex. zolédronate). Dans tous les cas, seuls les effecteurs présentant un fort potentiel cytotoxique, préalablement validé in vitro, seront utilisés in vivo.

- Etude de l'efficacité du traitement standard dans 4 à 6 modèles de GBM en fonction de leur sous-type moléculaire. Chaque modèle nécessitera 42 animaux afin de tester la chimiothérapie et la radiothérapie indépendamment ou en combinaison.

- Evaluation du potentiel thérapeutique de l'administration de différents effecteurs immunitaires. Cette étape sera réalisée en utilisant un seul modèle de GBM et un seul protocole de radio-chimiothérapie, les plus pertinents pour l'effecteur utilisés. Ainsi pour chaque effecteurs 3 lots de 7 souris seront nécessaires (radio-chimio-thérapie seule, LT seuls, combinaison des deux).

- Confirmation du bénéfice thérapeutique dans d'autres modèles de GBM. Si les résultats obtenus dans le modèle de référence démontrent une amélioration de la survie, 1 ou 2 effecteurs, le(s) plus efficace(s) seront utilisés dans 1 à 3 autres modèles de GBM, à raison de 3 lots de 7 souris pour chaque effecteur dans chaque modèle.

L'objectif final de ce projet est d'obtenir des preuves précliniques (faisabilité, efficacité) justifiant l'exploitation du transfert adoptif d'effecteurs cytotoxiques dans le traitement du GBM chez l'homme. D'où l'importance d'inclure le traitement standard et de valider cette approche dans différents

modèles, afin de prendre en compte la forte hétérogénéité des tumeurs de GBM caractéristique de cette pathologie et donc les variabilités de réponse à ce traitement standard en fonction des sous-types de GBM.

Ce projet sera réalisé en accord avec la règle des 3R.

Remplacer : Nos modèles animaux sont pour l'heure, indispensable car ils présentent la complexité du fonctionnement d'un organisme entier, nécessaire pour les études précliniques de ce projet.

Réduire : Ce projet devrait nécessiter l'utilisation 588 animaux. Pour réduire au maximum le nombre d'animaux, différentes étapes seront réalisées successivement et les modalités d'administrations des différents traitements choisis ont déjà été validé dans notre laboratoire.

Raffiner : Afin de prévenir au maximum le stress et la souffrance des animaux, les souris seront maintenues en groupe sociaux, dans un environnement enrichi, suivies quotidiennement. Des points limites précoces ont été définis pour éviter toute souffrance. La procédure chirurgicale d'implantation des cellules tumorales est réalisée sous anesthésie et analgésie générale. De plus, de la xylocaïne en gel est appliquée sur la cicatrice afin de renforcer l'analgésie localement. Les souris sont également placées sur tapis ou bloc chauffant tout au long de cette procédure afin de limiter au maximum l'hypothermie. Afin de s'assurer que l'opération s'est bien passée et que l'animal est le moins possible affecté, les souris sont maintenues en observation après l'opération et ce jusqu'à 2 heures après le réveil, temps suffisant à un retour à un comportement normal des animaux.

12594 Les Leucémies, Lymphomes et le Myélome Multiple sont les cancers hématologiques les plus communs. En France chaque année, ils touchent plus de 33 000 personnes, et particulièrement aux deux extrémités de la vie : les enfants et jeunes adultes, et les personnes âgées. Chacune de ces 3 principales catégories de cancers hématologiques, Leucémies, Lymphomes, et Myélome Multiple, couvrent de multiples entités distinctes dont le pronostic et le traitement sont très différents. Ses diversités trouvent leur origine dans l'hématopoïèse, le système de production et de renouvellement des cellules sanguines et des cellules impliquées dans la réponse immunitaire. En effet, ces hémopathies malignes sont dues à des altérations des cellules du sang qui interviennent à différents stades de leur maturation et provoquent leur prolifération anormale.

Nous proposons donc de développer de nouveaux modèles disséminés représentatifs de ces hémopathies malignes in vivo grâce à des xénogreffes intraveineuses de cellules primaires ou de lignées cellulaires. Ces nouveaux modèles pourront être établis avec ou sans humanisation préalable des souris en fonction de la dépendance des pathologies au microenvironnement. Pour la mise au point de ces modèles, nous utiliserons au maximum 6 animaux par échantillon de cellules tumorales à tester avec un maximum de 20 échantillons testés par an, soit sur 5 ans un maximum de 600 souris utilisées.

Grace à ces modèles, nous pourrons ensuite tester l'efficacité de nouvelles molécules ou d'associations de médicaments in vivo sur la croissance tumorale de ces pathologies. Pour cela, nous utiliserons au maximum 96 souris par molécule testée (8 groupes de 12 souris : contrôle, molécule de référence, molécule à tester à 3 doses maximum, association molécule de référence et molécule à tester à 3 doses maximum), avec un maximum de 10 molécules testées par an sur 5 ans, soit un total maximum de 4800 souris sur 5 ans.

Ce projet prévoit donc l'utilisation au maximum de 5400 souris sur 5 ans (étant dans l'impossibilité de prévoir le nombre d'échantillons de cellules primaires obtenus par an ainsi que le nombre de molécules à tester, ceci est une estimation très haute).

Ce projet sera réalisé en accord avec la règle des 3R.

Remplacer : Ne sachant pas reproduire in vitro un système intégré aussi complexe que le corps humain, les études in vivo utilisant des animaux sont indispensables pour valider les stratégies de thérapie au cours d'études précliniques.

Réduire : toutes les études in vivo seront précédées d'une étude in vitro sur un large panel de lignées cellulaires ou de cellules primaires afin de sélectionner le(s) modèle(s) et de réduire le

nombre d'animaux nécessaires à l'étude de ces nouvelles molécules ou associations de médicaments.

Raffiner : Le suivi quotidien des souris est fait avec une grille de score permettant d'évaluer le degré de douleur ou d'inconfort et d'y remédier avec le traitement le plus approprié, comme l'utilisation d'antalgiques. De plus, des méthodes non-invasives du suivi de l'expansion tumorale seront mises au point comme le suivi de la taille de la rate par échographie ou le suivi des cellules tumorales bioluminescentes par imagerie. Par ailleurs, les souris sont maintenues en groupe sociaux dans des cages pourvues d'enrichissement (petits morceaux de papiers leur permettant de faire un nid).

12595 La maladie de Pompe (glycogénose de type II) est une maladie génétique due à un déficit en alpha-glucosidase acide (GAA). La GAA étant la seule enzyme responsable de la dégradation du glycogène en glucose dans les lysosomes. Il en résulte une surcharge en glycogène dans tous les tissus de l'organisme, principalement les muscles squelettiques, le cœur et le système nerveux central. Le spectre clinique varie des formes infantiles sévères à des formes plus progressives d'apparition tardive. La forme infantile est la plus sévère, avec une atteinte du cœur conduisant au décès avant l'âge de 2 ans. La forme adulte est plus progressive. Tous les patients atteints de la maladie de Pompe ont en commun l'atteinte des muscles squelettiques, se traduisant par une faiblesse musculaire, associée à des difficultés respiratoires.

L'administration intraveineuse à vie de l'enzyme GAA recombinante (rhGAA) permet de corriger la cardiomyopathie et d'augmenter l'espérance de vie des patients atteints de la forme infantile. Cependant, cette thérapie est lourde et contraignante, nécessitant une administration toutes les deux semaines d'un coût très élevé (~500 000 euros/patient/an). De plus, ce traitement n'est que partiellement efficace sur les muscles squelettiques, malgré l'usage de doses élevées. De nouvelles stratégies thérapeutiques doivent donc être développées pour tenter de corriger l'atteinte musculaire squelettique chez les patients. Plusieurs études menées chez des patients ou dans des modèles murins de la maladie démontrent une implication de l'autophagie, voie de dégradation de composants cellulaires par fusion avec les lysosomes, dans la pathogenèse de la maladie. En effet, l'atteinte du flux autophagique entraîne la séquestration de l'enzyme recombinante rhGAA lorsqu'elle est administrée, l'empêchant d'accéder aux lysosomes (organelle cible présentant une surcharge en glycogène).

Notre étude vise à rétablir le flux autophagique en association avec une correction du métabolisme du glycogène par modulation d'une cible thérapeutique unique dans le muscle squelettique du modèle murin *6neo/6neo* de la maladie de Pompe. Ainsi, cette stratégie devrait permettre par combinaison d'augmenter le bénéfice thérapeutique d'un traitement par thérapie génique ou encore de l'enzymothérapie substitutive.

Pour atteindre cet objectif, l'utilisation d'un vecteur AAV9 recombinant va permettre d'induire la surexpression de la version humaine du gène FoxO3a (AAV9-FoxO3a), ce dernier agissant à la fois sur l'autophagie et le métabolisme du glycogène. Ce vecteur est utilisé par voie intraveineuse chez des souris nouveau-nées avant fermeture de la barrière hémato-encéphalique (Jour 0 ou Jour 1) pour obtenir la transduction de tous les tissus cibles (muscles squelettiques et système nerveux central principalement). Au cours d'études antérieures, nous avons réalisé une étude dose-réponse pour déterminer la dose et le volume nécessaire de vecteur à injecter. Ensuite, une étude visant à étudier l'effet de l'expression de FoxO3a (et de ces mutants) sur l'autophagie et le métabolisme du glycogène a été menée. Ceci nous a permis d'identifier la forme de FoxO3a à utiliser pour obtenir le meilleur bénéfice thérapeutique. Grâce à cette étude, nous avons montré que la surexpression de FoxO3a chez des souris Pompe nouveau-nées permettait de prévenir l'apparition de l'atteinte du flux autophagique et de diminuer la surcharge en glycogène dans le muscle strié squelettique à court terme (4 mois).

Ce projet a déjà bénéficié d'un avis favorable du comité d'éthique en 2015. Cependant, l'intégralité des expérimentations contenues dans la saisine précédente n'a pas pu être réalisée dans le temps initialement demandé (principalement à cause de problème de production de vecteur). C'est ainsi

dans l'objectif de pouvoir terminer notre projet de recherche que nous faisons une demande d'avenant de la saisine précédente.

Deux procédures restent à réaliser : (i) une étude ultra structurale des fibres musculaires par microscopie électronique, (ii) ainsi qu'une caractérisation du bénéfice clinique à long terme sur des souris Pompe traitées avec vecteur AAV9-FoxO3a.

Le dessin expérimental respectera le principe des 3R :

Remplacer : l'utilisation d'un modèle murin présentant les caractéristiques de la maladie est le modèle le plus pertinent pour étudier l'effet de la modulation de notre cible thérapeutique. Les animaux utilisés seront des souris wild- type injectés PBS (contrôle sains), des souris GAA-KO 6neo/6neo injectées PBS (contrôles malades) et des souris GAA-KO 6neo/6neo injectées AAV (animaux traités).

Réduire : des groupes expérimentaux pertinents seront constitués pour les expérimentations, ce qui représente un nombre nécessaire pour constituer des groupes analysables statistiquement. Au total, 39 animaux seront inclus dans le projet.

Raffiner : Au cours des procédures expérimentales, les animaux seront systématiquement anesthésiés avant de recevoir une injection intraveineuse de vecteur ou de PBS. Le risque d'hypothermie sera régulé en plaçant les rongeurs sur tapis chauffant jusqu'à leur réveil, avant d'être replacés auprès de leur mère. Une surveillance régulière sera réalisée tout au long de la journée pour suivre l'état de santé des animaux. Tout du long de l'étude, les animaux seront surveillés quotidiennement et un vétérinaire sera prévenu en cas d'anomalies ou de signes de douleur visibles. Une grille comportementale a été mise en place afin de permettre une évaluation de la douleur chez les animaux, ainsi que les critères limites pouvant justifier l'arrêt prématuré du protocole et induire une euthanasie. Ces critères concerneront l'apparence générale des animaux, leur poids, les signes cliniques apparents ainsi que leur comportement. En fonction du score obtenu, des dispositions adaptées seront prises. Dans le cas de l'observation d'une douleur, les animaux seront analgésiés à l'aide de METACAM® à 0,25mg/kg en injection sous-cutanée. Concernant leur hébergement, tous les animaux auront libre accès à l'eau et à la nourriture durant toute la durée des expériences. Ils seront conservés dans une atmosphère surveillée tout au long du protocole (température, hygrométrie, ...).

12596 L'épilepsie du lobe temporal, souvent déclenchée par un évènement ponctuel (crise initiale déclenchée par une forte fièvre, une infection, un accident...), se caractérise par la survenue de crises intermittentes et souvent imprévisibles, parfois des mois ou même des années après la crise initiale. Les épilepsies du lobe temporal sont souvent résistantes à tous les traitements antiépileptiques. Afin d'agir si possible avant le stade pathologique irréversible, il est par conséquent d'un grand intérêt thérapeutique de comprendre comment le circuit passe d'une crise isolée à un état chronique d'épilepsie résistante, après une période de latence sans crise. Le but de ce projet est d'étudier les modifications neuronales du circuit hippocampique (principal siège de l'épilepsie du lobe temporal chez l'humain) afin de mieux comprendre la genèse de l'épilepsie, dans sa phase aigüe initiale et dans sa transition vers la phase chronique.

L'étude de modèles animaux est essentielle pour identifier les mécanismes en cause. Cette étude sera donc réalisée sur des modèles expérimentaux chez le rongeur (souris), qui reproduisent cette dualité entre crise aigüe (déclenchée par l'injection ponctuelle d'agents convulsivants) et épilepsie (chronique). Nous profiterons également des possibilités offertes chez la souris par les techniques de biologie moléculaire (optogénétique) permettant de manipuler l'activité de populations neuronales spécifiques afin de mieux comprendre comment elles contrôlent le circuit hippocampique et la genèse de l'épilepsie.

Les avantages escomptés du projet sont une meilleure compréhension du fonctionnement cérébral et de ses pathologies (notamment l'épilepsie), ce qui représente un intérêt sociétal considérable. Ce projet respecte les principes de la règle des 3R t.

Remplacer : Le projet porte sur l'étude de la dynamique des interactions neuronales impliquées dans la transition entre crise ponctuelle et épilepsie chronique. Ceci ne peut se faire que sur l'animal

vivant car il n'existe pas de modèle réaliste de cette transition progressive vers l'épilepsie in vitro ou in silico. Nous avons opté pour l'utilisation de la souris car ces rongeurs présentent le meilleur équilibre entre les bénéfices (accessibilité expérimentale et pertinence par rapport aux pathologies chez l'humain) et les dommages escomptés (souffrance liées aux conditions d'élevage ou d'expérimentation).

Réduire : Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux permettant d'assurer la fiabilité statistique de notre étude. Nous utiliserons ainsi 380 souris sur 8 mois.

Raffiner : A part dans la période de récupération post-chirurgicale, les animaux seront hébergés en cages collectives. Les cages seront également enrichies en nids de coton. Les actes chirurgicaux seront effectués dans les règles de l'art du point de vue de l'asepsie, de l'anesthésie, et sous traitement antalgique. Une surveillance particulière sera portée aux animaux en période péri-opératoire. Des analgésiques seront administrés en cas de douleur. Des points limites sont définis pour mettre fin à l'expérimentation en cas de douleur ou de souffrance excessive, notamment associée à l'état épileptique.

12597 Ce projet a pour but d'étudier comment les mécanismes mis en place lors du développement cardiaque sont réactivés lors de pathologies cardiovasculaires chez l'adulte et ainsi proposera de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles en vue de thérapies régénératrices chez l'adulte. Le potentiel thérapeutique des cibles identifiées sera évalué sur un modèle chirurgical d'infarctus du myocarde et par la mesure de paramètres physiologiques fonctionnels (échocardiographie).

La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés. Ainsi ce projet utilisera 1295 souris.

Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'étude de cellules cardiaques en culture ne permet pas d'analyser les interactions cellules-cellules telles qu'elles sont situées dans le cœur entier. De plus, en culture, les cellules ne sont pas sujettes au débit et à la pression du sang non plus qu'aux nombreux autres facteurs et signaux qui sont le propre d'un organisme entier et vivant. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés (transgéniques et knockouts) représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies humaines.

Tout au long de l'expérimentation nous nous attacherons à reconnaître la douleur, la quantifier via une échelle, agir lorsque les critères d'interruption prédéfinis sont atteints, noter dans le registre des animaux les observations faites et les actions entreprises.

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

Remplacer : notre projet se fera dans la continuité d'une étude in vitro. Le passage au modèle in vivo est une étape indispensable pour modéliser le fonctionnement cardiaque en tenant compte des facteurs hémodynamiques.

Réduire : Le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour mettre en évidence une modification significative des biomarqueurs qui seront suivis.

Raffiner : Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant le Raffiner de l'environnement. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et des personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et le bien-être des animaux sont contrôlés. et leurs besoins physiologiques seront respectés (nourriture ad libitum, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Des points limites clairs seront définis et les animaux seront euthanasiés s'ils atteignent les critères d'interruption.

12598 Notre équipe s'intéresse à l'organisation cellulaire du neurone qui lui permet de remplir ses fonctions uniques de transmission de l'information dans le cerveau. Dans ce cadre, nous étudions le cytosquelette neuronal qui est constitué de protéines impliquées dans le transport des molécules à l'intérieur des cellules et dans le maintien de leur organisation. Notre étude utilise des approches

de microscopie de super-résolution, un ensemble de techniques nouvelles qui permettent d'observer l'organisation des complexes moléculaires dans l'environnement natif de la cellule.

Ces approches nécessitent de travailler sur des cultures de neurones réalisées à partir de cerveau d'embryons de rats âgés de 18 jours. Ce modèle cellulaire est parfaitement adapté pour l'étude de l'architecture des neurones en microscopie. En particulier, il est le seul modèle permettant d'obtenir des neurones et leurs prolongements à très basse densité, ce qui rend les approches précises de microscopie super-résolutives possibles. Il a été mis au point dans le laboratoire de Gary Banker au début des années 1980 et est aujourd'hui la méthode de référence pour l'étude de l'organisation subcellulaire des neurones.

Pour réaliser ces cultures nous utilisons des rates gestantes, commandées chez un éleveur professionnel. Les animaux sont hébergés à l'animalerie quelques jours avant d'être mis à mort. Nous prélevons ensuite les cerveaux des embryons et dissociions les neurones pour les mettre en culture sur des lamelles de verre, puis nous étudions la pousse des neurones et l'évolution de leurs propriétés en fonction de leur développement. En effet, lors de la mise en culture, les neurones qui ont perdu leur morphologie d'origine vont récapituler les différentes phases bien caractérisées de leur développement. Ainsi, après trois jours, il y a apparition de prolongements cellulaires appelés axones et dendrites puis les neurones commencent à interagir entre eux par l'intermédiaire de jonctions particulières appelées synapses. Ce réseau synaptique se complexifie au cours du temps. Nous pouvons étudier l'évolution de la morphologie et de la fonction de ces neurones pendant environ un mois ce qui est leur durée de survie moyenne. Les caractéristiques biologiques de ces neurones semblent similaires à ce qui est connu chez l'animal, ce qui valide la pertinence du modèle. La culture permet aussi de manipuler génétiquement des neurones ou de délivrer facilement des agents pharmacologiques puis d'observer les conséquences de ces traitements sur les cellules.

Ce projet respecte les principes des 3R

Remplacer : Tous les nouveaux outils moléculaires que nous utilisons (nouveaux anticorps, nouveaux agents pharmacologiques par exemple) sont testés sur des lignées cellulaires. Ces cellules ne présentent pas de propriétés neuronales mais elles se multiplient très facilement et ne nécessitent pas de prélèvement sur des animaux.

Réduire : Le nombre de femelle gestante est réduit au minimum c'est à dire à 1 par semaine, soit 48 femelles par an et 240 pour 5 ans. Une femelle gestante permet de lancer une culture de neurones chaque semaine, ce qui rend possible le travail de l'ensemble de l'équipe en continu. Ce besoin limité en animaux est rendu possible par la faible densité de culture qui ne demande pas un grand nombre de neurones à l'ensemencement des cellules, une particularité de notre modèle de culture comparé aux cultures de neurones utilisées habituellement à plus forte densité, et qui nécessitent plus d'animaux.

Raffiner : Selon la réglementation en vigueur, les rates gestantes sont livrées quelques jours avant la date prévue de mise bas. A leur arrivée et jusqu'à leur mise à morte, nous nous assurons que toutes les mesures sont prises pour améliorer les procédures scientifiques et les conditions d'élevage, pour minimiser les souffrances, le stress et améliorer le bien-être des animaux. Le personnel est qualifié et assisté d'un vétérinaire permettant de gérer les animaux de façon appropriée : habituation pour diminuer le stress et enrichissement de l'environnement des animaux pour améliorer leur bien-être (alvéoles à œufs).

12599 La transplantation rénale est le premier choix de traitement de l'insuffisance rénale au stade terminal. La lésion d'ischémie-reperfusion (IR) est une séquence qui comprend le prélèvement de l'organe (phase d'ischémie avec arrêt du flux sanguin), sa conservation et son implantation chez le receveur (phase de reperfusion avec récupération de l'apport sanguin). Ces différentes étapes ont un rôle majeur dans le dysfonctionnement du greffon et la perte de celui-ci. L'objectif de ce projet est de réaliser une lésion d'ischémie-reperfusion sur le rein d'une souris puis de prélever ce rein (après euthanasie de l'animal) pour étudier sa structure et évaluer les dégâts causés par la lésion. La structure des reins sera analysée en IRM fonctionnelle et en histologie. Ces résultats permettront

de mieux comprendre ce qu'il se passe et de développer des moyens pour mieux préserver la viabilité de l'organe lors d'une greffe. Les souris subiront une chirurgie au niveau de leur rein droit uniquement. Le rein opéré sera prélevé le lendemain ou 7 jours après l'opération. Les lieux d'hébergement et d'expérimentation sont différents. Le transfert des animaux d'un lieu à l'autre se fera dans une cage de transport dédiée munie d'un couvercle filtrant. Le trajet dure quelques minutes.

Ce projet respecte les principes des 3R

Remplacer : Il n'y a pas de méthodes alternatives pour reproduire ce genre de lésion sur un organe. Les résultats obtenus nous permettront d'améliorer la qualité du greffon dans le cadre des transplantations rénales ce qui améliorerait considérablement la qualité de vie des personnes ayant besoin d'une greffe de rein.

Réduire : Le nombre de souris nécessaire au projet a été déterminé afin d'être statistiquement représentatif (test t student). Nous utiliserons 23 souris pour ce projet, réparties en 3 groupes : 1 groupe de 3 souris non opérées (leurs reins serviront de référence) et 2 groupes de 10 souris opérées dont l'expérimentation s'arrêtera le lendemain (10 souris) ou 7 jours après la chirurgie (10 souris).

Raffiner : Les souris sont hébergées en groupes sociaux avec un enrichissement du milieu (maison en carton, coton) fourni par l'animalerie. Dans le cadre de l'acte chirurgical, une analgésie est mise en place et les souris sont placées sur un tapis thermostaté pendant la chirurgie afin de maintenir une bonne température corporelle. Le suivi post-opératoire sera réalisé quotidiennement par l'expérimentateur. Des points limites précoces seront définis. En cas de souffrance, les souris recevront un analgésique. Si la souffrance persiste malgré le traitement, l'expérimentation sera arrêtée.

12600 La coccidiose est une maladie provoquée par le développement et la multiplication de parasites du genre *Eimeria* dans la muqueuse intestinale des volailles. Cette coccidiose, considérée comme étant le premier fléau de l'aviculture, engendre des pertes financières dans les élevages avicoles qui sont principalement dues à une baisse de production des poulets et à l'usage d'anticoccidiens. Cependant, l'utilisation prolongée des anticoccidiens conduit à l'émergence de souches d'*Eimeria* résistantes soulignant la nécessité de trouver des moyens de lutte alternatifs. L'utilisation d'extraits naturels végétaux (ENV) et des huiles essentielles (HE) dans l'aliment représente une alternative intéressante aux anticoccidiens conventionnels. Plusieurs études ont prouvé que des composés d'ENV et d'HE pouvaient limiter et diminuer les risques de coccidioses cliniques tout en maintenant les performances zootechniques des poulets de chair. Cependant, la majorité de ces études ont été réalisées à partir de combinaisons d'ENV ou d'HE qui ne permettent pas de déterminer précisément les molécules responsables de l'effet anticoccidien.

A l'issue d'une collaboration avec un partenaire privé, nous avons identifié, *in vitro*, plusieurs composés ENV et d'HE qui inhibent le développement des parasites. L'objectif de ce projet est d'évaluer en modèle *in vivo*, l'efficacité antiparasitaire des composés sélectionnés (étude 2). Cependant, nous souhaitons tout d'abord réaliser un essai préliminaire (étude 1) afin de s'assurer 1/ de l'innocuité des composés administrés en continu dans l'aliment, 2/ qu'ils n'ont pas d'effet négatif sur les performances zootechniques des poulets. En effet, nous ne pouvons pas écarter la possibilité d'un effet indésirable sur le poulet, même si ces composés sont des produits autorisés en tant qu'additifs dans l'alimentation des animaux (conformément à la directive européenne 70/524/EEC).

Pour ce faire nous utiliserons au maximum 504 poulets (étude 1 préliminaire = 216 poulets, étude n°2 = 288 poulets).

Ce projet a été établi dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : A l'heure actuelle, aucune alternative *in vitro* fiable ne permet d'évaluer des produits qui peuvent agir sur les performances zootechniques des poulets

Réduire : De manière à limiter le nombre d'animaux, les composés ont été présélectionnés *in vitro*. En effet, un premier criblage a permis de retenir 4 solutions parmi la quarantaine de composés

testés. Ce criblage a permis de réduire considérablement le nombre de lots. Pour l'étude 1, 4 lots avec un aliment supplémenté avec des ENV ou HE seront comparés à deux lots contrôles : un lot recevra un anticoccidien déjà commercialisé (Maxiban) et un lot témoin qui aura une alimentation sans traitement. A partir de l'étude 1, les 3 meilleurs suppléments alimentaires seront sélectionnés pour l'étude 2 afin d'évaluer leur protection vis-à-vis de la coccidiose. Ces lots seront comparés à 2 lots témoin : NINT (non infecté/non traité) et INT (infecté/non traité) et au lot infecté/traité au Maxiban. Le nombre d'animaux par lot est adapté aux buts de ces deux études.

Raffiner : Pour les deux études, les poulets seront hébergés en batterie chaude puis en cages adaptées à leur taille, dans des conditions environnementales contrôlées, avec nourriture et eau à volonté et disposeront d'un enrichissement social et comportemental (petites plaques en inox suspendues ce qui permet aux animaux de piquer dedans). Des points limites précoces et spécifiques sont définis pour éviter toute souffrance.

12601 Les sarcomes sont des tumeurs rares très complexes et hétérogènes qui touchent environ 4000 personnes par an en France. Après la chirurgie, peu de traitement sont disponibles hormis des chimiothérapies classiques souvent peu efficaces. Il existe donc dans cette pathologie un réel besoin de nouvelles thérapies plus ciblées permettant une meilleure efficacité et moins d'effets secondaires. Dans ce contexte, de nombreuses études ont montré ces dix dernières années que les changements épigénétiques contribuaient au développement des cancers, notamment en causant la perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et l'expression aberrante de gènes facilitateurs. Parmi ces régulateurs épigénétiques, une méthyltransférase, la protéine PRMT5, apparaît comme une cible intéressante. Elle est en effet surexprimée dans de nombreux cancers et cette surexpression est associée à un mauvais pronostic, notamment dans les cancers du sein ou les glioblastome. Au vue de ces données, de nombreux inhibiteurs dirigés contre PRMT5 ont été développés dont un que nous testons actuellement dans notre laboratoire. Nos études in vitro ont montré que cette molécule dernière génération permettait de réduire la viabilité des cellules cancéreuses de sarcomes de manière très efficace. Nous souhaiterions donc maintenant vérifier cette efficacité in vivo dans des modèles de sarcomes xéno greffés chez des souris immunodéficientes. L'objectif est ici de vérifier son efficacité dans un système intégré en monothérapie mais également en combinaison avec d'autres thérapies. Pour réaliser ce projet, nous estimons avoir besoin de 120 souris immunodéficientes sur un an.

Dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : Nous avons étudié les effets biologiques et pharmacologiques de nombreuses nouvelles molécules en développement sur des lignées de sarcomes in vitro. Nous souhaitons dorénavant étendre ces études à un modèle plus complet qu'est le petit animal. En effet, l'oncogenèse est un modèle intégré qui fait intervenir un grand nombre de mécanismes physiologiques et de tissus avoisinants qui ne peuvent être modélisés in vitro. Nous devons donc avoir recours à un modèle physiologique complet et fonctionnel.

Réduire : Nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. La croissance tumorale des cellules greffées sera suivie de manière longitudinale tout au long de l'expérience ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner : Le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort, les animaux seront hébergés en groupe et l'enrichissement de leur milieu de vie sera systématique. Les animaux recevront une surveillance quotidienne et des soins adaptés (administration d'analgésiques et anesthésiques en pré et/ou postopératoire, mesure hebdomadaire du poids des souris et du volume tumoral, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt).

12602 Le projet de recherche fondamentale que nous mènerons pendant 5 ans consiste à déterminer le rôle du sommeil dans la mémoire. Cette question est primordiale sur le plan humain car les souvenirs que nous formons définissent qui nous sommes, et sur le plan pathologique car il n'est

pas envisageable de guérir les troubles affectant la mémoire si nous ne connaissons pas son fonctionnement.

L'approche expérimentale de ce projet utilise des souris qui seront réutilisées à travers différents protocoles. Chez le rongeur, l'environnement est encodé par des réseaux de neurones qui sont distribués dans différentes aires cérébrales, principalement l'hippocampe. Ces informations encodées vont circuler dans ces circuits avant d'y être stockées, particulièrement pendant le sommeil. Cependant, nous n'en connaissons pas les mécanismes précis. De plus, de nombreuses études montrent que le l'hypothalamus semble contrôler le sommeil paradoxal, mais là non plus les mécanismes sont méconnus. Le principal marqueur de l'activité des neurones et des circuits qu'ils forment est leur activité électrique. Notre but est de comprendre, grâce à l'enregistrement de cette activité électrique, comment l'hippocampe et l'hypothalamus communiquent pendant le sommeil paradoxal. Pour révéler l'identité précise des circuits impliqués, nous utiliserons une approche permettant de manipuler directement l'activité de neurones ciblés grâce à des outils optogénétiques, une technique permettant d'insérer dans des neurones précis un "interrupteur" contrôlé par la lumière ou un agent chimique. Nous pourrons ainsi éteindre ou allumer des groupes de neurones choisis pendant différents états de vigilance pour établir le mode de communication des circuits neuronaux et le rôle du sommeil paradoxal. Ces "interrupteurs" seront insérés dans les aires cérébrales d'intérêt grâce à des vecteurs viraux injectés in situ sous anesthésie générale dans un premier protocole chez des souris transgéniques. Cela nous permettra de viser des populations choisies de neurones. Dans un second protocole, nous utiliserons des microsondes pour enregistrer sous anesthésie générale l'activité de base des aires cérébrales impliquées dans le sommeil paradoxal. Cette première étape, qui mime les phases de sommeil, est indispensable pour établir une première cartographie des réseaux neuronaux. Dans un troisième protocole, nous placerons chirurgicalement ces microsondes dans les aires cérébrales impliquées dans les processus mnésiques afin de suivre, manipuler et décoder l'activité électrique des différents neurones et circuits pendant le sommeil. Enfin, les animaux seront mis à mort avec une méthode adaptée et respectueuse afin de prélever les cerveaux pour des analyses anatomiques.

Ce projet est conforme aux exigences de la règle des 3R.

Remplacer : Comme la mémoire ne peut être appréhendée que sur des individus réactifs, il est nécessaire d'utiliser des animaux vigiles pour ce type d'étude. Le caractère méconnu du fonctionnement cérébral implique que ce projet ne peut pas se passer de l'utilisation d'animaux afin d'en déterminer les mécanismes. Des études cliniques montrent que les régions cérébrales impliquées dans la mémoire et le sommeil paradoxal semblent conservées à travers les différentes espèces, les résultats de notre étude permettront de mieux extrapoler les mécanismes de représentation et de stockage des informations chez l'Homme. En apportant de nouvelles connaissances sur les réseaux neuronaux impliqués dans la formation de la mémoire, cette étude permettra à plus long-terme de mieux comprendre les pathologies qui y sont associées chez l'Homme, comme la maladie l'Alzheimer ou bien les troubles mnésiques associés au vieillissement.

Réduire : Ce projet utilise des outils de collection des données à la pointe de la technologie nous permettant d'obtenir des données fiables sur un faible échantillon. De plus, des tests statistiques adéquats nous permettront de limiter la taille des cohortes à un minimum (132 souris au total). Enfin, les protocoles utilisant des outils d'optogénétiques permettent de réduire encore le nombre d'animaux car chacun constitue son propre contrôle (avant versus après manipulation).

Raffiner : Ce projet propose des méthodes pertinentes pour limiter la douleur : des points limites adaptés et précoces ont été mis en place pour chaque procédure (comme les interventions chirurgicales) et prévoient des interventions rapides sur l'animal (analgésie et suivi post-opératoire, puis suivi quotidien des animaux). En effet, tous les actes invasifs seront pratiqués sous anesthésie générales utilisant une association de kétamine-xylazine-ropivacaïne. Il potentialise le bien-être animal car les conditions d'hébergement (animaux à plusieurs dans de grandes cages, eau et nourriture ad libitum, enrichissement avec nid végétal, dômes en cartons et divers objets) et de manipulation des animaux (temps important de socialisation entre l'expérimentateur et chaque animal) ont été élaborées pour minimiser au maximum le stress qui est néfaste à tout paradigme comportemental. Toutes ces conditions sont conformes à la législation en vigueur et permettent

d'être au plus près du comportement naturel de l'espèce animale. A la fin du protocole, les animaux seront euthanasiés (par overdose d'Euthasol (150 mg/kg) et le prélèvement du cerveau sera effectué afin de confirmer la bonne localisation cérébrale des microsondes et des éventuelles injections (des outils optogénétique).

12603 Les anticoagulants sont recommandés pour la prévention et le traitement de la maladie thrombo-embolique veineuse (TEV) et la prévention des événements thrombo-emboliques chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire (FA) et de syndrome coronaire aiguë (SCA). Les options thérapeutiques disponibles comptent, entre autres, les antagonistes de la vitamine K (AVK), et une catégorie nouvellement apparue d'inhibiteurs directs du Facteur X activé (i.e. Rivaroxaban). La combinaison des anticoagulants oraux avec les traitements antiplaquettaires dans la prévention secondaire après SCA apporte un bénéfice, cependant au prix d'une augmentation importante du risque d'événements hémorragiques majeurs.

Ce projet a pour objectif d'évaluer les effets relatifs des anticoagulants oraux en association ou non avec les traitements antiplaquettaires sur les fonctions plaquettaires. Avec comme hypothèse de travail que le traitement par anticoagulants oraux en monothérapie pourrait prévenir le risque thrombotique sans effet délétère sur le risque hémorragique.

Pour se rapprocher de la pathologie humaine, nous utiliserons un modèle de thrombose artérielle chez la souris et nous déterminerons si les différents anticoagulants oraux affectent l'adhésion et l'agrégation plaquettaire et le dépôt de fibrine au niveau du site de lésion vasculaire. L'ensemble des expériences décrites dans ce document nécessitera 244 souris.

Ce projet est conforme aux exigences de la règle des 3R.

Remplacer : La thrombose est un processus intégré qui fait intervenir de multiples acteurs cellulaires, le flux sanguin, et les protéines plasmatiques. Les modèles in vitro ne sont pas encore assez sophistiqués pour appréhender la complexité de ce processus. Il est donc nécessaire de recourir à un modèle animal pour modéliser les caractéristiques de cette pathologie humaine. Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront remplacées par des études in vitro sur cellules.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés lors des expériences sera réduit au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Il a été estimé en prenant en compte les paramètres suivants : l'hypothèse est que le traitement est efficace s'il diminue l'aire du thrombus de 65 % ; un risque alpha fixé à 5% et un risque beta (puissance) à 80%.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées. La procédure sera réalisée sur des animaux anesthésiés. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt. La souris étant un animal social, les animaux seront hébergés par groupe de 3 ou 4 souris par cage. L'établissement utilisateur a mis en place un enrichissement qui consiste en la présence d'un igloo en polycarbonate et de fibres de calage en carton.

12604 L'addiction aux opiacés représente un coût majeur pour la société et les recherches sont toujours menées pour essayer de mettre au point des molécules pouvant traiter ces addictions.

Dans le cadre d'études précliniques sur une molécule prometteuse, nous avons été missionné par une société privée pour réaliser une prestation de service. Cette société fait appel à nos compétences particulières dans la mise en œuvre d'auto administration intraveineuse de drogues chez l'animal, dans le but de tester l'hypothèse chez le rat que la substance « X » réduit, voire bloque l'auto-administration volontaire d'héroïne, motivée par ses propriétés récompensantes. Ce modèle préclinique de prise volontaire par l'animal d'opiacés est en général requis pour démontrer la potentielle efficacité d'une molécule dans la lutte contre l'addiction aux opiacés.

Ce projet implique au total 14 rats, et nous mettons tout en œuvre pour respecter au mieux le bien-être animal et le principe des 3R.

Remplacer : Le modèle animal ne peut pas être remplacé, dans cette étude, par d'autres méthodes alternatives n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants.

Réduire : L'effectif des animaux a été ajusté au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiques, tout en tenant compte des variations interindividuelles et du pourcentage de perte lors des chirurgies.

Raffiner : Les animaux sont hébergés dans des animaleries thermorégulées et disposent d'un milieu enrichi selon les normes dictées par les Directives Européennes. Les animaux sont manipulés régulièrement afin d'inhiber tout stress et sont observés quotidiennement afin de réagir au plus vite en cas d'apparition de signes de souffrance. Etant particulièrement vigilants à la prise en charge de la douleur, nous avons mis en place des points limites spécifiques et précoces, ainsi que des mesures prophylactiques et analgésiques adaptées, avec des mesures de Raffiner telles que l'utilisation d'un tapis chauffant pour maintenir la température corporelle des animaux lors des procédures chirurgicales.

12605 Certaines bactéries entéropathogènes (Salmonelles, Shigelles, Yersinia, E. coli...) sont un problème majeur de santé publique et sont responsables d'infections digestives provoquant la mort de 5 à 10 millions d'enfants par an dans les pays en voie de développement. La virulence de ces bactéries est en partie due à un système d'injection de leurs protéines effectrices appelé injectisome.

Alors que les protéines effectrices injectées au moyen de l'injectisome sont variées et dépendent de la spécificité du pathogène, trois des protéines structurales composant l'injectisome sont relativement bien conservées parmi les différentes bactéries pathogènes. Des résultats issus de la littérature ont montré que certaines de ces protéines, fortement impliquées dans la virulence des bactéries, sont des cibles de choix pour lutter contre des infections opportunistes impliquant des bactéries pathogènes, et ce dans un contexte d'antibiorésistance qui ne fait que s'aggraver.

Nous nous proposons d'étudier l'effet protecteur induit soit par vaccination (immunothérapie active) de rongeurs avec des protéines structurales de l'injectisome des bactéries entéropathogènes citées précédemment, soit induit par administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces protéines (immunothérapie passive) déjà produits au laboratoire. Au préalable, une étude pilote sera menée pour déterminer la dose de bactéries à injecter pour les 10 souches bactériennes testées. A terme, nous souhaitons développer un produit (vaccin ou anticorps) le plus simple et le moins coûteux possible, capable de protéger contre différents types d'infections.

Ce projet est conforme aux exigences de la règle des 3R.

Remplacer : Cet objectif ne peut être atteint sans se passer de l'animal car, à ce jour, aucune technique in vitro ne permet de reproduire efficacement l'ensemble des conditions nécessaires au déclenchement de la réponse immunitaire qui se déroule au sein d'un organisme entier.

Réduire : Le nombre d'animaux pour le projet a été réduit au minimum nécessaire de 2900, mais comprend l'ensemble des expériences qui seront menées sur 5 ans. Ce nombre est un maximum, et il est possible voire probable qu'en fonction des résultats obtenus ce nombre soit revu à la baisse, tout en restant suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences. L'étude pilote permettra d'affiner ce nombre d'animaux qui sera probablement revu à la baisse en fonction des résultats obtenus.

Raffiner : Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés et sont nés et élevés en captivité. L'état de santé et le bien-être des animaux seront surveillés tout au long de l'expérience et évalués grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

12606 La vasorine (Vasn) est une protéine transmembranaire impliquée dans la signalisation du TGF- β . Cette protéine pourrait être impliquée dans des syndromes néphrotiques rares ou acquis, des troubles osseux ou plus généralement dans les maladies cardiovasculaires. Initialement étudiée

dans le développement, la Vasn est exprimée chez la souris adulte dans de nombreux tissus et notamment les artères, les os, les dents et les reins. La génération de souris Vasn Ko conditionnel a permis de mieux comprendre le rôle de la Vasn en particulier sur la fonction et la structure vasculaire. Deux types de souris Vasn Ko conditionnel ont été développés. L'un des modèles utilise des souris Cre ubiquitaire croisées avec des souris lox+/+ permettant l'extinction de l'expression de la Vasn dans l'ensemble des tissus et l'autre modèle utilise des souris Cre SMMHC croisées avec des souris lox+/+ permettant uniquement l'extinction de l'expression de la Vasn au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. Consécutivement aux premiers résultats sur la fonction vasculaire, il est important de pouvoir continuer à caractériser le rôle de la Vasn en s'intéressant à ses effets sur la pression artérielle et sur la fonction cardiaque. L'étude de ces paramètres sera réalisée sur les deux modèles de souris Vasn Ko conditionnel (2 lots de 15 souris/lot) ainsi que sur leurs témoins (4 lots de 6 souris/lot) soit un total de 6 lots correspondant à 54 souris. Pour cela deux procédures seront mise en place. La première procédure concerne les modalités d'injection du tamoxifène permettant l'inactivation du gène ainsi que les modalités de mesure de la pression artérielle. La seconde procédure correspond aux modalités de réalisation de l'échographie cardiaque. Au terme de l'étude ou pour les animaux nécessitant la mise à mort en cours d'étude, ceux-ci recevront une injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital (Exagon® ou produit équivalent en fonction de l'évolution des prescriptions et en accord avec le vétérinaire référent).

Les mesures prises en vue de respecter le principe des 3Rs sont les suivantes :

Remplacer : La vasorine ayant un rôle très complexe et étant exprimée dans de nombreux tissus, les études in silico ne peuvent à l'heure actuelle répondre aux questions fondamentales et l'utilisation de modèles animaux reste indispensable. Notre choix s'est porté sur un modèle de souris car c'est le modèle le plus utilisé, le plus accessible et reconnu par l'ensemble de la communauté scientifique pour la génération d'animaux Ko

Réduire : L'effectif des animaux a été ajusté au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiques fiables et reproductibles. Un grand nombre de paramètres histologiques et fonctionnels seront évalués sur les mêmes animaux.

Raffiner : Toutes les précautions d'usage en terme d'anesthésie seront mises en œuvre lors de la réalisation des échographies cardiaques. De plus, toutes les mesures seront mises en œuvre afin de limiter la douleur des animaux. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt. Un enrichissement du milieu de stabulation (litière adaptée à la nidification, nids, fond sonore musical) sera effectué pour favoriser le bien-être des animaux qui seront hébergés à plusieurs par cage pour maintenir des groupes sociaux.

12607 L'immunothérapie avec des anticorps (anti-CTLA4 et/ou anti-PD1) dirigés contre les checkpoints inhibiteurs de la réaction immunitaire, est utilisée en cancérologie notamment dans le traitement du mélanome métastatique. Les résultats très prometteurs avec ces molécules laissent envisager leur utilisation dans d'autres types de cancers. Le fait de déréguler la réponse immunitaire peut entraîner, chez certains patients traités, des effets secondaires immunologiques (cutanés, endocriniens, digestifs ou hépatiques) dont les symptômes sont ceux retrouvés chez les patients atteints de maladies auto-immunes. Ces effets secondaires, dus au dysfonctionnement du système immunitaire qui s'attaque alors aux cellules du soi, peuvent entraîner la mort du patient.

Nous souhaitons, en partant de ces données cliniques, développer un modèle de maladies auto-immunes chez la souris humanisée qui nous permettrait d'évaluer le potentiel thérapeutique de nouveaux anticorps spécifiques des cellules humaines immunitaires permettant de contrôler ces réactions auto-immunes. Tous les animaux seront analysés post-mortem avec des prélèvements d'organes en vue d'études immunohistochimiques ou histologiques permettant de caractériser au mieux l'effet des molécules testées.

Dans cette saisine, la règle des 3R sera suivie de la façon suivante :

- **Remplacer** : Les anticorps que nous souhaitons tester in vivo ont déjà été validés in vitro. Cependant le passage aux modèles in vivo est indispensable pour définir leurs effets dans des

contextes inflammatoires plus complexes. A notre connaissance, il n'existe pas à ce jour de modèle in vitro mimant la situation complexe que constitue le système immunitaire humain c'est pourquoi nous avons besoin d'utiliser un modèle de souris humanisées.

- Réduire : Puisqu'il n'existe pas d'autres modèles complexes pour valider l'effet de nos anticorps, les données issues de ce projet devront donc être suffisamment robustes (c'est à-dire validées avec tests statistiques). Nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques (Test de Mann-Whitney) car nous ne pourrions pas nous assurer d'une distribution normale ($n < 30$). Nombre total d'animaux = 585

- Raffiner : Les animaux seront suivis quotidiennement lorsque les cellules humaines seront injectées. Les signes cliniques notables et sévères, observés lors de la surveillance quotidienne des animaux, seront notés dans une grille d'évaluation. Lorsque deux signes cliniques notables seront présents alors il sera administré deux fois par jour une dose de morphinique (buprénorphine 0.05mg/kg en sous cutané), puis lorsque 3 signes cliniques notables ou un seul signe clinique sévère seront notés alors les animaux seront sortis du protocole et euthanasiés.

12608 Dans le cerveau, l'information est transmise de neurones en neurones au niveau d'une structure spécialisée, la synapse. Afin que cette transmission ait lieu de manière efficace et adaptée, il est important de considérer le rôle d'une autre cellule, l'astrocyte. En effet, cette cellule, communément appelée cellule gliale régule l'efficacité avec laquelle les neurones communiquent. Pour se faire, tout comme les neurones, les astrocytes libèrent des substances actives, appelées gliotransmetteurs, comme la D-sérine.

Dans l'hippocampe, une structure jouant un rôle clé dans la mémoire et l'apprentissage, les astrocytes, en libérant la D-sérine, contrôlent à l'échelle cellulaire la mémoire synaptique. Alors que cette libération dépend d'une augmentation de calcium dans la cellule, nous ne savons toujours pas d'où ce calcium provient.

Le but de ce projet est de mieux comprendre comment la mémoire se forme en identifiant la source de calcium nécessaire à la disponibilité en D-sérine à la synapse, elle-même nécessaire pour la mémoire.

L'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation de 392 souris C57BL/6J, dont deux lignées transgéniques non dommageables, de même fond génétique.

Les mesures prises en vue de respecter le principe des 3Rs sont les suivantes :

Remplacer : Il n'existe actuellement pas de modèle in vitro et donc de méthode alternative permettant de remplacer les animaux.

Réduire : Nous avons réduite à 392 le nombre d'animaux que nous prévoyons d'utiliser pour une période de 5 ans. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable.

Raffiner : Des mesures seront mises en place durant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien par du personnel qualifié). Enfin, des points-limites ont été établis entraînant une prise en charge de l'animal afin d'anticiper toute souffrance et réduire au mieux l'inconfort des animaux (anesthésie, analgésie, gel oculaire, tapis chauffant,...).

12609 La stéatohépatite non-alcoolique est une maladie hépatique chronique en progression constante dans les pays occidentaux, avec environ 550 000 personnes diagnostiquées par an. Les patients ayant une stéatohépatite présentent une accumulation pathologique de graisse dans le foie, qui s'accompagne d'un phénomène inflammatoire. Cette pathologie peut se compliquer d'une fibrose pouvant entraîner une cirrhose voire un carcinome hépatocellulaire. Les complications sont d'autant plus fréquentes et graves chez les patients ayant un diabète de type II. Il n'existe pas actuellement de traitements efficaces contre la stéatohépatite, et la seule manière fiable de la diagnostiquer est la biopsie. Le but de ce projet de recherche est de développer et valider des marqueurs non-invasifs,

notamment d'imagerie, capables de remplacer la biopsie chez le patient, et d'aider ainsi la validation de traitements contre la stéatohépatite.

Il n'existe pas actuellement de modèle animal qui imite parfaitement la stéatohépatite humaine : nous utiliserons, chez la souris, deux modèles induits par régime (sur 16 (n = 45) et 20 semaines (n = 90), qui occasionnent des degrés de surcharge en graisse, d'inflammation et de fibrose différents. Utiliser ces 2 modèles permettra ainsi d'estimer la sensibilité de chaque marqueur d'imagerie aux variations des caractéristiques tissulaires et fonctionnelles propres à la stéatohépatite. Nous étudierons également un groupe sous régime occasionnant une accumulation anormale de graisse mais sans inflammation (n = 90, 20 semaines), pour différencier les effets de l'inflammation et de la surcharge en graisse sur les marqueurs d'imagerie, et un groupe sous régime normal (n = 90). Chaque animal sera soumis à une session d'IRM sans agent de contraste et d'échographie avec agent de contraste au cours du régime, puis euthanasié pour prélèvements tissulaires. Plusieurs paramètres d'imagerie seront mesurés, permettant d'évaluer la quantité de fibrose hépatique, la quantité de graisse, la présence d'inflammation, la souffrance cellulaire des hépatocytes et la perfusion hépatique. 315 souris seront utilisées au cours de ce projet de 3 ans.

Ce projet a été établi dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : Les modèles de stéatohépatite induits par régime chez la souris permet d'étudier les interactions entre le foie et les autres contingents lipidiques, ce qui n'est possible de faire qu'en étude corps entier et donc avec un modèle animal.

Réduire : Le nombre d'animaux par groupe a été choisi pour respecter les tests statistiques. L'imagerie multiparamétrique et multimodale réalisée sur les animaux permettra de mesurer de nombreux paramètres caractérisant de multiples facettes de la stéatohépatite. Les échantillons tissulaires et sanguins récupérés en fin d'expérience seront distribués et analysés par de nombreux laboratoires pour maximiser l'utilisation des animaux.

Raffiner : De plus, les techniques d'imagerie sont connues. Les régimes utilisés ainsi que les sessions d'imagerie réalisées sous anesthésie et avec monitoring constant n'occasionnent aucune douleur ou angoisse chez les animaux. Des points-limites généraux et spécifiques ont été définis pour évaluer la souffrance animale ; si les critères d'arrêt sont atteints, l'animal sera euthanasié.

12610 L'infection à *M. ulcerans*, ou ulcère de Buruli, est une maladie négligée émergente. Cette infection, qui touche principalement les enfants, est surtout diagnostiquée dans les zones humides de l'Afrique de l'Ouest et Centrale. Les lésions débutent généralement par un nodule évoluant en une ulcération qui s'étend dramatiquement. La destruction tissulaire est due à l'action d'une toxine, la mycolactone. Malgré leur étendue, les lésions ne sont pas douloureuses. Actuellement, le traitement est limité, il fait appel à l'antibiothérapie (rifampicine/streptomycine ou clarithromycine) pour les formes précoces. Mais la prise en charge des formes avancées est le problème majeur, d'autant plus que les lésions étendues engendrent des séquelles importantes. La prise en charge est donc pluridisciplinaire et requiert un temps d'hospitalisation très long (>3 mois) dans des centres spécialisés éloignés du domicile des patients. Ce temps d'hospitalisation est long en raison d'une réparation tissulaire lente et représente un coût exorbitant. La prise en charge des patients pourrait donc être améliorée en diminuant le temps d'hospitalisation. Le principal axe qui pourrait être amélioré pour atteindre cet objectif, consisterait à accélérer la cicatrisation. Elle pourrait être accélérée en associant l'antibiothérapie à un traitement qui permet un contrôle de la réponse inflammatoire locale facilitant la cicatrisation. C'est dans ce contexte que notre projet s'inscrit. Plus précisément il vise à évaluer l'effet du régime cétogène et d'un métabolite issu de ce régime en association avec l'antibiothérapie. En effet dans ce contexte, nous avons montré qu'un régime cétogène favorisait le contrôle du développement des lésions causées par *M. ulcerans* via un contrôle de l'inflammation, et parallèlement et indépendamment nos collègues ont démontré qu'un métabolite issu du régime cétogène considéré comme un complément alimentaire favorise la réparation tissulaire.

Un nombre total de 756 souris sera nécessaire à ce projet. Cette étude a été rédigée et pensée de manière à respecter la règle des 3 R

Remplacer : Le bien-être animal a été l'une des priorités dans la conception de cette étude mais nous ne pouvons à ce stade nous passer d'utiliser des animaux.

Réduire : C'est pourquoi nous n'utiliserons que le nombre d'animaux nécessaires pour mener à bien cette étude et tous les résultats obtenus seront utilisés et exploités.

Raffiner : Un suivi adapté des animaux a été instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, mais aussi la détresse ou l'anxiété qu'elles pourraient éprouver. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté (cabanons, papier, tubes en carton). Un suivi régulier sera effectué sur l'ensemble des animaux et des indicateurs comportementaux et physiques sont définis et constituent les points limites, à partir desquels nous avons établi des critères d'arrêt. Pour éviter toute souffrance lors du protocole expérimental, un anesthésique gazeux (isoflurane) sera utilisé. Ce projet s'inscrit ainsi dans une gestion éthique de l'expérimentation animale et est donc en accord avec les réglementations européennes et françaises de bonnes pratiques de laboratoire.

12611 Les patients souffrant du syndrome de CLOVES (Congenital Lipomatous Overgrowth, Vascular Malformation, Epidermal Naevi) ou de troubles apparentés présentent des déformations majeures et des tumeurs vasculaires dues à des mutations d'un gène, appelé PIK3CA. Ce gène régule la prolifération et la croissance des cellules. Lorsqu'il est trop activé comme au cours de ces syndromes, il est responsable d'une croissance excessive des parties du corps touchées par la mutation. Ainsi la présentation clinique des patients est très variable en fonction du nombre de tissus affectés, pouvant aller d'une macrodactylie (gros doigt isolé) à des formes très sévères touchant l'ensemble du corps telles que le syndrome de CLOVES. La prévalence de cette affection rare n'est pas connue (<1/10.000 cas).

Au cours des formes les plus graves, il existe des excroissances de tissu graisseux, des malformations vasculaires, une scoliose, des manifestations touchant le squelette comme un élargissement majeur des os ou encore des déformations d'organes tels que le cerveau ou les reins.

Jusqu'à présent aucun traitement curatif n'était disponible pour ces patients dont le pronostic pouvait être engagé à court ou moyen terme. Les seules options thérapeutiques consistaient en des traitements symptomatiques, et pour les cas les plus graves, des embolisations ou des chirurgies mutilantes pour préserver les organes ou les membres sains. Enfin, il est important de noter que ces syndromes sont fréquemment associés à des douleurs chroniques et ont un retentissement majeur sur la qualité de vie des patients et sur leur vie sociale.

Nous avons récemment identifié un médicament développé pour une autre indication et qui, administré aux patients souffrant d'une forme très sévère du syndrome de CLOVES, a apporté une amélioration de leur qualité de vie. Cependant nous sommes dans une situation peu courante : le médicament améliore les patients, mais la connaissance de la physiopathologie de la maladie, de sa progression et du mécanisme d'action de ce traitement ne sont pas élucidés.

Un modèle murin a été précédemment utilisé pour comprendre le développement de la pathologie. C'est un modèle génétiquement modifié cependant ce modèle non spécifique ne permet pas de comprendre et d'apprécier le rôle de chaque type de tissu atteint. Nous souhaitons maintenant étudier l'effet de la mutation PIK3CA dans chaque tissu de l'organisme (graisse, muscle, os, vaisseaux lymphatiques, vaisseaux artériels, vaisseaux veineux et les nerfs) en utilisant des modèles génétiques appropriés. Pour cela nous créerons les modèles génétiques appropriés. Enfin nous testerons l'efficacité du médicament identifié précédemment dans chacune des conditions. Ceci nous permettra de comprendre de manière plus précise la physiopathologie de ces syndromes.

Tout au long de l'expérimentation nous appliquerons la règle des 3R :

Remplacer dès que possible les expériences animales par des expériences in vitro

Réduire avec l'utilisation d'un nombre minimal d'animaux pour avoir la puissance statistique (n= 600 souris).

Raffiner en évitant toute souffrance inutile des animaux en les surveillant attentivement. Le traitement est donné sous forme de gavage quotidien qui sera effectué par un technicien

expérimenté et diplômé. Le volume des gavages sera réduit au minimum possible. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12612 La thérapie génique est une stratégie innovante qui consiste à apporter un gène thérapeutique dans des tissus ou cellules malades. Elle permet de guérir ou prévenir des affections que l'on pensait incurables, tels que les maladies génétiques. L'utilisation de vecteurs recombinants dérivés des virus adéno-associés (AAVr) constituent des outils de choix. En effet il a été montré qu'une seule injection par voie intramusculaire (IM) ou intraveineuse (IV) dans des modèles animaux et chez l'homme, permettait l'expression à long terme du transgène véhiculé. De plus, le premier produit de thérapie génique autorisé à la commercialisation fut le Glybera, un AAVr injecté en intramusculaire pour les patients déficients en lipoprotéine lipase.

Cependant, dans certains cas, une réponse immunitaire cytotoxique dirigée contre le produit du transgène peut entraîner la perte d'expression du transgène dans le muscle. Étonnamment, dans certaines études récentes chez le primate (injecté en IM et IV) il a été observé une réponse immunitaire dirigée contre le produit du transgène mais sans la perte d'expression du transgène. De plus, la présence d'infiltrats de cellules immunitaires potentiellement immunomodulatrices a été mise en évidence au niveau des muscles transduits. Ces observations suggèrent l'existence d'une balance immunitaire après transfert de gène via des AAVr dans le muscle. Ces mécanismes ont également été observés chez l'homme et restent encore incompris.

La compréhension de ces mécanismes immuns passe par une analyse approfondie des cellules immunitaires infiltrées aux niveaux des tissus transduits. Il est donc important de développer un modèle rongeur qui pourrait reproduire ce que l'on observe chez l'homme et le primate non-humain, c'est-à-dire une expression à long-terme du transgène en présence de cellules immunitaires infiltrées au niveau des tissus transduits. Les analyses seront réalisées à deux mois post-injection, les données recueillies permettront de mieux appréhender les observations faites chez les patients traités par thérapie génique.

Ce projet a été établi dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'utilisation d'un modèle in vivo pour analyser et décrypter la complexité des interactions vecteur-hôte chez le patient est inévitable. En effet les modèles in vitro ne permettent pas d'étudier la complexité de ces interactions car tous les éléments constituant une réaction immunitaire nécessitent le fonctionnement d'un organisme entier. A ce jour, les mammifères sont donc les seuls organismes permettant d'étudier la réponse immunitaire de l'hôte face au vecteur AAVr. Le rat est un modèle pertinent pour cette étude.

Réduire : Le projet prévoit d'inclure 35 rats répartis en cinq cohortes caractérisées par des paramètres d'injection différents (voie injection et différents vecteurs). C'est un nombre minimal pour assurer la reproductibilité et l'analyse des résultats par test statistiques.

Raffiner : Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en place selon la procédure. Les injections de vecteurs et les prélèvements sanguins se dérouleront sous anesthésie gazeuse de courte durée (environ 10min). L'état général et l'alimentation des animaux seront surveillés quotidiennement par les techniciens animaliers et le vétérinaire. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12613 Suite au développement d'un nouveau dispositif médical implantable permettant la délivrance de molécules de façon contrôlée et avec une meilleure précision en locorégionale, nous souhaitons procéder à une évaluation de son efficacité comparée à une méthode de traitement classique du glioblastome, le CED. La croissance tumorale et la survie entre les deux méthodes de traitement sera évaluée afin d'en déterminer l'efficacité.

L'étude se déroulera sur un maximum de 50 jours au cours desquels 4 groupes expérimentaux de 12 rats seront constitués. L'ensemble des rats se verra implanté des cellules tumorales (9L).

2 groupes seront implantés avec le dispositif implantable et une pompe osmotique, un groupe témoin avec injection de sérum physiologique et un groupe sera traité à l'aide de Témzolomide. 2

groupes recevront une injection par CED, un groupe témoin recevra une injection de sérum physiologique et un groupe sera traité à l'aide de Témzolomide.

La croissance tumorale sera évaluée par IRM tous les 5j. Les résultats obtenus suite à l'examen IRM (croissance tumorale) seront analysés en utilisant un test non-paramétrique pour échantillons indépendants de Kruskal-Wallis suivi d'un post-hoc Dunn's.

Ce projet a été établi dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : Le recours à des modèles animaux permet une évaluation d'un dispositif pour la délivrance de principes actifs en cancérologie dans une situation de microenvironnement complexe impossible à reproduire in vitro.

Réduire Un maximum de 48 rats pourra être inclus dans ce projet pour répondre aux problématiques explorées. C'est un nombre minimal pour assurer la reproductibilité et l'analyse des résultats par test statistiques.

Raffiner : Des points limites liés au comportement de l'animal (état général et masse de l'animal (perte de 10%) ont été fixés avec une mise en place de critères d'arrêt. Une attention particulière étant portée au maintien en normothermie des animaux à chaque phase, y compris lors de la chirurgie et de l'examen en Imagerie par Résonance Magnétique par l'utilisation de tapis chauffant. Toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale. Les animaux reçoivent un antidouleur et un anti-inflammatoire avant et après la procédure de chirurgie. Un protocole d'antalgie est appliqué pendant 3j après la chirurgie (anti inflammatoire dans l'eau de boisson et anti douleur). Les animaux seront suivis quotidiennement et leur état évalué à partir d'une grille d'évaluation. Les animaux seront hébergés en groupes et auront à leur disposition de l'eau et de la nourriture à volonté. Il sera mis à leur disposition un abri et de la cellulose pour la constitution d'un nid.

12614 Ce projet a pour but d'étudier les premières étapes du développement du système cardiovasculaire. Le suivi et l'étude des tout premiers progéniteurs cardiaques permettront une meilleure compréhension des mécanismes de la différenciation de ces progéniteurs vers un destin cardiaque particulier. Globalement, nos résultats permettront d'approfondir la connaissance des étapes précoces du développement cardiaque et seront potentiellement pertinents pour générer des cellules cardiaques définies (ventricules droit ou gauche, oreillette, etc...) à grande échelle en vue de thérapie cellulaire. Ils pourraient également être importants pour comprendre la survenue de certaines cardiopathies congénitales. Le contrôle par Mesp1 du choix de l'identité cardiaque et la différenciation des progéniteurs cardiaques sont conservés à travers l'évolution. De plus, il existe chez la souris des modèles de cardiopathies congénitales qui permettent d'étudier les mécanismes de ces maladies. Le modèle murin est ainsi un modèle animal approprié pour l'étude des progéniteurs cardiaques et des maladies cardiaques congénitales.

Ce projet a été établi dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'étude de progéniteurs cardiaques en culture (issu de la différenciation des cellules souches embryonnaires) ne permet pas d'analyser les interactions cellule-cellule ou la migration de ces progéniteurs dans un contexte cellulaire et temporel finement régulé chez l'embryon. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés représentent des atouts pertinents pour suivre spécifiquement ces progéniteurs cardiaques et obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement correct du cœur. Chaque expérience, pouvant être évitée chez l'animal, ne nécessitant pas d'interaction cellule-cellule ou d'aspect uniquement trouvés chez l'embryon, sera systématiquement réalisée en culture sur cellules souche embryonnaire, notre modèle alternatif.

Réduire : La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique statistiquement valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés. Ainsi ce projet utilisera au total 528 souris. De plus, la littérature sera analysée régulièrement afin de ne pas répéter des expériences déjà publiées.

Raffiner : Les souris utilisées dans ce projet seront élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement et dans un

environnement contrôlé (cycle lumineux 12h/12h). Les animaux sont élevés en présence d'objets (safe crinkles kraft et smart homes) permettant le Raffiner de l'environnement et dans de conditions de bonne socialisation (les animaux de même sexe seront élevés dans des cages de 335, 530, ou 1000 cm² avec au maximum 2, 5 ou 10 souris adultes par cage selon la réglementation européenne, les accouplements seront effectués dans des cages de 530 cm² avec 1 male et 2 femelles). Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et des personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et le bien-être des animaux sont contrôlés.

Les expériences, consistant en une injection de doxycycline (antibiotique), devraient engendrer peu de douleurs aux animaux. Tout au long de l'expérimentation nous nous attacherons cependant à reconnaître la douleur et à agir afin de la réduire. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt. Les observations faites et les actions entreprises seront alors notées dans un registre dédié.

12615 Le projet de recherche fondamentale que nous mènerons pendant 5 ans consiste à déterminer comment le cerveau encode et mémorise les informations. Cette question est primordiale sur le plan humain car les souvenirs que nous formons définissent qui nous sommes, et sur le plan pathologique car il n'est pas envisageable de guérir les troubles affectant la mémoire si nous ne connaissons pas son fonctionnement.

L'approche expérimentale de ce projet utilise des rats qui seront réutilisés à travers différents protocoles. Chez le rongeur, l'environnement est encodé par des réseaux de neurones qui sont distribués dans différentes aires cérébrales, principalement le cortex et l'hippocampe. Ces informations encodées vont circuler dans ces circuits avant d'y être stockées à plus ou moins long terme. Cependant, nous ne savons toujours pas comment les informations y circulent et y sont pérennisées. De plus, de nombreuses études montrent que le thalamus semble contrôler le transfert d'informations entre l'hippocampe et le cortex, mais là non plus les mécanismes sont méconnus. Le principal marqueur de l'activité des neurones et des circuits qu'ils forment est leur activité électrique. Nous utiliserons des microsondes pour enregistrer sous anesthésie générale l'activité de base des aires cérébrales impliquées dans les processus mnésiques. Cette première étape, qui mime les phases de sommeil, est indispensable pour établir une première cartographie des réseaux neuronaux. Dans un second temps, nous placerons chirurgicalement ces microsondes dans les aires cérébrales impliquées dans les processus mnésiques afin de suivre et décoder l'activité électrique des différents neurones et circuits à travers un paradigme comportemental. Dans un autre protocole, un rongeur apprendra la localisation d'une récompense dans un labyrinthe (ce qui constitue l'information à encoder) qui sera consolidée au fil des jours, plus particulièrement le sommeil. Le suivi de cette trace mnésique nous permettra d'identifier les circuits impliqués et caractériser comment elle se traduit et se fixe au cours du temps, et de caractériser le rôle des différentes phases de sommeil. Dans un autre protocole, nous aborderons le rôle du thalamus dans ces processus. Nous réaliserons sous anesthésie générale des lésions focales de ces régions et testerons la performance des animaux dans la tâche mnésique décrite précédemment, et caractériserons le devenir de cette trace mnésique dans les circuits. Les animaux seront à la fin mis à mort avec une méthode adaptée et respectueuse afin de prélever les cerveaux pour des analyses anatomiques.

Ce projet est conforme avec les exigences de la règle des 3R. Comme la mémoire ne peut être appréhendée que sur des individus réactifs, il est nécessaire d'utiliser des animaux vigiles pour ce type d'étude.

Remplacer : Le caractère méconnu du fonctionnement cérébral implique que ce projet ne peut pas se passer de l'utilisation d'animaux afin d'en déterminer les mécanismes. Des études cliniques montrent que les régions cérébrales impliquées dans la mémoire semblent conservées à travers les différentes espèces, les résultats de notre étude permettront de mieux extrapoler les mécanismes de représentation et de stockage des informations chez l'Homme. En apportant de nouvelles connaissances sur les réseaux neuronaux impliqués dans la formation de la mémoire,

cette étude permettra à plus long-terme de mieux comprendre les pathologies qui y sont associées chez l'Homme, comme la maladie l'Alzheimer ou bien les troubles mnésiques associés au vieillissement.

Réduire : Ce projet utilise des outils de collection des données à la pointe de la technologie nous permettant d'obtenir des données fiables sur un faible échantillon. De plus, des tests statistiques adéquats nous permettront de limiter la taille des cohortes à un minimum. Le projet utilisera 192 rats Long Evans au total.

Raffiner : Ce projet propose des méthodes pertinentes pour limiter la douleur : des points limites adaptés et précoces ont été mis en place pour chaque procédure (comme les interventions chirurgicales) et prévoient des interventions rapides sur l'animal (analgésie et suivi post-opératoire, puis suivi quotidien des animaux) avec une mise en place de critères d'arrêt. Tous les actes invasifs seront pratiqués sous anesthésie générale utilisant le sévoflurane ou une association de kétamine-xylazine-ropivacaïne. Il potentialise le bien-être animal car les conditions d'hébergement (animaux à plusieurs dans de grandes cages, eau et nourriture ad libitum, enrichissement avec nid végétal, tubes en cartons et divers objets) et de manipulation des animaux (temps important de socialisation entre l'expérimentateur et chaque animal) ont été élaborées pour minimiser au maximum le stress qui est létal à tout paradigme comportemental. Toutes ces conditions sont conformes à la législation en vigueur et permettent d'être au plus près du comportement naturel de l'espèce animale. A la fin du protocole, les animaux seront euthanasiés (par overdose d'Euthasol 150 mg/kg) et le prélèvement du cerveau sera effectué afin de confirmer la bonne localisation cérébrale des microsondes et des injections des agents de lésion.

12616 Les bactéries pathogènes *Escherichia coli* adhérentes et invasives (Adherent Invasive *Escherichia coli*, AIEC) ont été isolées dans l'intestin de patients atteints de maladie de Crohn mais sont absentes chez les sujets sains. La maladie de Crohn est caractérisée par une dérégulation de la réponse immunitaire au sein de la muqueuse intestinale, notamment des réponses lymphocytaires, conduisant à l'installation d'une inflammation chronique. Ce projet vise à étudier comment les bactéries AIEC pourraient contribuer à initier et/ou à entretenir d'une réponse lymphocytaire intestinale anormale similaire à celle observée dans la maladie de Crohn. A long terme, la compréhension des mécanismes de pathogénicité des AIEC à l'échelle moléculaire et cellulaire permettra d'identifier de nouvelles pistes de diagnostic et/ou thérapeutiques pour ces patients.

L'objectif de ce projet est d'étudier, en réponse à l'infection par les bactéries AIEC, l'activation et la fonctionnalité des lymphocytes dans la muqueuse intestinale. Un antigène-modèle, l'ovalbumine, sera utilisé : les expériences seront réalisées sur des souris infectées par voie orale avec des bactéries (souches AIEC ou souches non-pathogènes) génétiquement modifiées pour exprimer l'ovalbumine. Ces souris seront soit génétiquement modifiées pour répondre à l'ovalbumine, soit auront reçu des lymphocytes anti-ovalbumine par voie intraveineuse avant l'infection.

Ce projet a été établi dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'expérimentation animale est indispensable pour ce projet : en effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de rendre compte de la complexité d'une réponse immunitaire. Cette exploration in vivo permettra de mettre en évidence une réponse lymphocytaire contre les bactéries AIEC et de la caractériser.

Réduire : Chaque expérience sera exploitée au maximum (étude parallèle de différents organes) pour réduire le nombre d'animaux nécessaire. Le nombre maximal d'animaux utilisés est estimé à 147 souris.

Raffiner : Les expériences proposées induisent un niveau de stress et de douleur léger à modéré. Néanmoins des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt. Des antalgiques seront administrés aux animaux si nécessaire et la surveillance sera renforcée en cas de signes de souffrance.

12617 L'adrénoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD) est une maladie neurodégénérative très sévère de l'enfant et de l'adulte. Il existe deux phénotypes principaux :

1) une forme cérébrale démyélinisante (ALD cérébrale) qui touche les garçons entre 4 et 12 ans, plus rarement des hommes adultes et dont l'évolution spontanée est létale en peu d'années.

2) l'adrénomyeloneuropathie (AMN), une forme beaucoup plus fréquente qui touche la moelle épinière des hommes adultes, entre 20 et 50 ans, et qui frappe aussi 50% des femmes hétérozygotes après l'âge de 40 ans. L'AMN se caractérise par une paraparésie spastique sévère progressive, une ataxie sensorielle et un dysfonctionnement sphinctérien.

Ces formes de la maladie sont toutes les deux causées par des mutations du gène ABCD1 codant pour l'ALDP, une protéine transmembranaire peroxysomale impliquée dans le transport d'esters-CoA des acides gras à très longue chaîne (AGTLC) du cytosol au peroxysome. Les patients atteints accumulent les AGTLC dans le plasma et les tissus.

A ce jour, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (HSCT-Hematopoietic stem cell transplantation) d'un donneur ou manipulées par thérapie génique lentivirale est le seul traitement des formes cérébrales d'ALD (formes les plus sévères de la maladie). Il n'existe actuellement aucune thérapie pour l'AMN. La plupart du temps, l'utilisation d'une canne ou d'un fauteuil roulant dans les 10 à 15 ans suivant l'apparition des premiers symptômes devient indispensable. Notre projet a pour but de développer une approche de thérapie génique afin de traiter les hommes et les femmes affectés par l'AMN en transduisant les oligodendrocytes de la moelle épinière avec le gène ABCD1.

L'étude se propose d'évaluer, chez le macaque fascicularis, différentes voies d'administration d'un vecteur recombinant adéno-associé de sérotype 9 (rAAV2/9) porteur d'un transgène sous contrôle d'un promoteur sélectif dans le but de cibler spécifiquement les oligodendrocytes de système nerveux central. Ce type cellulaire a été choisi car les oligodendrocytes sont les cellules responsables de la myélinisation. Pour cela, 12 macaques fascicularis mâles, jeunes adultes et séronégatifs à l'AAV9, seront inclus dans cette étude. Il s'agit d'une étude « pilote », comportant un faible nombre d'animaux, pour définir la meilleure voie d'administration (parmi 3 voies possibles) du vecteur de thérapie génique afin de traiter les zones pertinentes du système nerveux central. Le modèle primate est le seul qui permette de répondre à cette question étant donné la similitude anatomique et fonctionnelle de son système nerveux central avec celui de l'homme.

Groupes expérimentaux :

1) Administration du vecteur par voie intrathécale : n=6

2) Administration du vecteur par voie intraveineuse : n=3

3) Administration du vecteur par voie intra-cérébrale et intra-sciatique associées : n=3. Cette étape du projet est exploratoire et qualitative et le petit nombre de primates envisagé n'a pas pour objet d'analyse statistique.

A la fin de l'étude, 4 semaines après l'injection du vecteur, les animaux seront euthanasiés pour une analyse du système nerveux et des organes périphériques.

Règle des 3R :

Remplacer : les études réalisées chez le singe apportent des connaissances transposables à l'homme en termes d'efficacité, d'immunogénicité, et de toxicité de l'AAV. La complexité des mécanismes cellulaires en jeu au niveau de l'organisme entier et la nécessité de connaître la réponse immunitaire ne permettent pas le recours à des méthodes substitutives, telles que les études in vitro isolées, et justifie notre recours à des animaux. Les structures et les fonctions cérébrales des macaques fascicularis sont très proches de celles de l'homme, ce qui permettra de recueillir des données extrapolables à l'homme concernant l'étude de la biodistribution du vecteur testé au cours de ce projet.

Réduire : cette étude originale par le choix du promoteur et des cellules ciblées inclut un faible nombre d'animaux et ne duplique aucune autre étude déjà réalisée chez le macaque. Elle fait suite à la réalisation d'études préalables menées chez le rongeur.

Pour cette étude chez le primate, le nombre d'animaux (n=3 à 6/groupe) est réduit à son minimum pour permettre une exploitation suffisamment fiable de résultats qualitatifs (transduction des oligodendrocytes) ne réclamant pas d'analyse statistique.

Raffiner : L'état général et l'alimentation des animaux seront surveillés quotidiennement (techniciens animaliers et vétérinaire). Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt. Des protocoles anesthésiques seront mis en place selon la procédure à réaliser. Les administrations expérimentales (injections intraveineuses, intrathécales, intracérébrales et intrasciatiqes) se dérouleront sous anesthésie générale et analgésie adaptée. Les prélèvements sanguins seront effectués sous protocole anesthésique permettant d'obtenir une anesthésie de courte durée (environ 10 min.). Pour favoriser les échanges sociaux entre animaux et favoriser leur bien-être, les macaques seront hébergés par groupes de 2 ou 3 minimum dès que possible et disposeront également d'un programme d'enrichissement regroupant un certain nombre d'activités :

- distribution de fruits frais/secs cachés dans la litière ou déposés en hauteur
- visionnage de films ou autres documentaires animaliers
- mise à disposition de jouets type Lego ND ou autre
- aménagement de l'habitat (cages de 3 m³ (H : 1960 cm, l : 1100 cm, P : 1400 cm) pour un à deux primates ou hébergement en volières en groupes dès que possible) pour favoriser les déplacements verticaux.

12618 L'exposition aux rayonnements ionisants à la suite d'un accident d'irradiation (accident dans une centrale nucléaire, manipulation d'une source radioactive...) ou d'un acte de malveillance peut engendrer des conséquences graves sur la santé des personnes impactées. En effet, l'irradiation d'une large surface du corps, à des doses d'irradiation moyennes à fortes, induit des lésions irréversibles regroupées sous le nom de syndrome aigu d'irradiation (SAI). Ce syndrome inclut des atteintes du compartiment sanguin, du système digestif, du système neuro-vasculaire et de la peau. A l'heure actuelle, les traitements ciblent préférentiellement le compartiment sanguin, et la prise en charge du syndrome gastro-intestinal (SGI) ne reste que symptomatique, alors que les diarrhées associées à ce syndrome peuvent engager le pronostic vital. Dans un précédent projet, nous avons montré que le traitement par certaines cellules issues de la graisse induit un effet anti-inflammatoire associé à une Réduire de la perméabilité épithéliale suggérant un effet bénéfique de ce traitement. Cependant, la ou les cibles cellulaires permettant à ces cellules de limiter les effets négatifs de l'irradiation restent inconnues.

L'objectif de ce projet sera de monter l'implication de certaines cellules de l'immunité, les cellules myélo-monocytaires, de l'hôte dans la capacité de régénération gastro-intestinale induite par les cellules issues de la graisse.

Ce projet a été établi dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : Pour comprendre de manière intégrée et fiable les mécanismes impliqués dans la réparation, nous devons utiliser des modèles expérimentaux précliniques in vivo, comme la souris, afin de démontrer des phénomènes à l'échelle d'un organisme entier.

Réduire : Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 550 pour les souris transgéniques CX3CR1- et 550 pour les souris transgéniques CCR2- et de 550 souris C57BL/6J de type sauvage, soit 1650 souris sur 3 ans. Le nombre de souris choisi pour ce projet est nécessaire et suffisant pour exploiter d'un point de vue statistique les résultats obtenus.

Raffiner Dans le contexte du bien-être animal, le Raffiner est assuré par le fait que ces animaux seront anesthésiés, prélevés et euthanasiés selon la réglementation en vigueur. Des points limites seront définis et des critères d'arrêt appliqués tout au long des procédures expérimentales constituant ce projet.

12619 L'immunothérapie constitue un véritable espoir dans le traitement de nombreux cancers, notamment dans ceux sans prise en charge efficace actuellement. Ce traitement consiste principalement en l'administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules tumorales ou sont activateurs de la réponse immunitaire anti-cancer. Cependant certains patients restent réfractaires au traitement ou la rémission est transitoire du fait notamment d'un échappement tumoral. Ces mécanismes d'échappement comprennent des mécanismes d'immunosélection, c'est à dire la capacité de la cellule tumorale à perdre des antigènes reconnus par le système immunitaire et des mécanismes d'immunosubversion (induction d'une tolérance spécifique). L'apparition de variants tumoraux moins immunogéniques peut plus facilement être délétère dans le cadre d'un traitement avec des anticorps monoclonaux (spécifiques d'un épitope unique). Ainsi un traitement par des anticorps polyclonaux ciblant plusieurs épitopes sur les cellules tumorales pourrait permettre de minimiser ce mécanisme d'échappement par apparition de variants. Pour lutter contre l'immunosubversion des thérapies combinées peuvent être envisagées associant des traitements ciblant les tumeurs avec d'autres permettant de lever les effets inhibiteurs sur le système immunitaire (des inhibiteurs de checkpoint). Des résultats préliminaires récents ont en effet montré l'importance et le rôle thérapeutique des réponses anticorps polyclonales anti-tumeur dans un modèle murin d'hépatocarcinome.

Nous développons des sérums polyclonaux hyperimmuns. Pour ce projet, les anticorps polyclonaux seront développés chez le lapin (APAFIS 16361) et seront ensuite administrés dans différents modèles murins de cancer, soit en monothérapie, soit en combinaison avec un inhibiteur de checkpoint immunitaire. Un nombre total de 220 souris sera utilisé pour ce projet.

Dans cette saisine la règle des 3R a été suivie comme suit :

- Remplacer : Du fait du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire, la validation d'un traitement par anticorps polyclonaux ne peut s'effectuer que dans un modèle in vivo.
- Réduire : le nombre de souris est réduit au minimum afin de permettre la reproductibilité et l'analyse des résultats par tests statistiques.
- Raffiner : des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en place selon la procédure. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt, avec un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos voûté, agressivité...). Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher

12620 La glande lacrymale est l'organe majoritairement responsable de la production du film lacrymal protégeant la surface de l'œil des agressions externes. Une glande lacrymale défectueuse mène à l'apparition de symptômes d'œil sec. Avec l'augmentation de la pollution environnementale et le vieillissement de la population, le syndrome d'œil sec touche un nombre croissant d'individus, avec notamment une incidence plus forte chez les personnes âgées.

Bien que la sécrétion de la glande lacrymale soit assez bien décrite dans la littérature, le développement de celle-ci reste peu détaillé. Néanmoins, la recherche fondamentale tendant à la compréhension des mécanismes essentiels se déroulant au cours de la formation de cette glande est nécessaire. L'accroissement des connaissances dans ce domaine permettra la progression de traitements visant à la régénération des fonctions physiologiques de la glande endogène.

Le but de notre projet est de caractériser l'influence des propriétés physiques et mécaniques sur le développement de la glande lacrymale, et notamment lors de la formation des conduits lacrymaux pendant le développement embryonnaire chez la souris.

Les expériences conduites seront planifiées de façon strictes et efficaces afin d'optimiser le respect des règles des 3R.

Remplacer : Ce projet, défini pour une durée de 5 ans, ne peut être envisagé que par l'utilisation de modèles animaux. En effet, les modèles d'organoïdes de glande lacrymale utilisent déjà des animaux et ne récapitulent pas toutes les caractéristiques physiologiques de la glande. Il n'existe

pas de modèle alternatif permettant de comprendre l'ensemble des caractéristiques de la glande lacrymale dans un contexte. Par ailleurs, l'utilisation de cultures cellulaires ou de modèles computationnels seront privilégiés dans la mesure du possible avant le passage au modèle in vivo physiologique.

Réduire : Pour cette étude, nous projetons d'utiliser un maximum de $n = 1100$ embryons plus 100 souris de type sauvage, adultes et gestantes permettant de récolter :

- 850 embryons au jour embryonnaire 15
- 50 embryons au jour embryonnaire 16
- 50 embryons au jour embryonnaire 17
- 50 embryons au jour embryonnaire 18

Les nombres proposés représentent un minimum suffisant d'animaux pour tirer des conclusions fiables et répondre à nos questions scientifiques. Les tissus adultes et embryonnaires seront partagés avec d'autres membres de l'équipe travaillant sur les intestins dans le but de mutualiser les animaux et réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner : Le bien-être des animaux sera de la plus haute importance, visant à réduire au maximum le stress. Les souris gestantes, seront sacrifiées à 15, 16, 17 et 18 jours de gestation et les embryons récoltés. Les glandes lacrymales seront disséquées à partir de ces embryons et mises en culture afin d'étudier le développement du conduit lacrymal par imagerie sur matériel vivant, ou directement fixées pour des analyses immunologiques.

12621 L'apparition de métastases dans un cancer constitue un facteur fort de l'aggravation du pronostic pouvant conduire au décès du patient. La complexité de ce processus laisse penser que de multiples altérations génétiques sont nécessaires à son accomplissement. Si jusqu'à présent, le modèle 'Darwinien' reposant sur l'acquisition progressive de mutations génétiques prédominait pour expliquer l'évolution tumorale, sa totale adéquation avec la biologie des métastases est aujourd'hui remise en question. De nouvelles théories ont donc émergé, parmi lesquelles la possibilité que les cellules cancéreuses puissent soudainement évoluer par transfert de matériel génétique suite à des événements de fusion cellulaire.

L'idée selon laquelle la fusion cellulaire puisse être impliquée en cancérologie a été avancée il y a plus d'un siècle par Otto Aichel. Cette théorie qui proposait que la malignité puisse provenir de l'union entre deux cellules n'est pas encore formellement démontrée mais reste cependant toujours d'actualité. Il n'est pas rare en effet d'observer, dans les cancers et en particulier au sein de lésions précancéreuses, des cellules anormales contenant deux jeux de chromosomes, qui pourraient d'une part être issues d'un tel processus, et d'autre part, favoriser l'instauration d'une instabilité génétique, reconnue comme caractéristique fondamentale de la cellule cancéreuse.

Les sarcomes à génétique complexe sont des tumeurs rares et agressives se développant au niveau des tissus de soutien de l'organisme. Le rationnel qui nous a amené à proposer que la fusion cellulaire puisse participer à la progression tumorale des sarcomes à génétique complexe repose sur les propriétés biologiques de ces tumeurs que nous avons pu recueillir in vitro et sur nos données anatomopathologiques. Nous avons ainsi pu observer ce phénomène in vitro dans toutes les lignées cellulaires de sarcome testées et montrer que le potentiel d'agressivité de ces lignées s'en trouvait augmenter.

Ce projet dont la finalité est l'amélioration de la santé humaine, a été établi dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : Ce projet est envisagé ici car il n'existe pas de modèles alternatifs in vitro ou in silico, qui nous permettraient de montrer dans des conditions les plus physiologiques possibles que la fusion de deux cellules puisse générer la formation de tumeurs et / ou favoriser la croissance tumorale, l'apparition de métastases. L'expérimentation in vivo est non substituable à aucune autre méthode car nous avons besoin d'un organisme complet pour étudier le développement des tumeurs. Réduire : Réduire : L'utilisation de techniques d'imagerie non-invasives permet ainsi d'observer au cours du temps un seul animal anesthésié permettant de réduire sensiblement le

nombre d'animaux utilisés. Ainsi 880 souris NGS (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) seront utilisées pour l'ensemble des expériences. Ce nombre a été défini pour utiliser un minimum d'animaux avec une puissance statistique suffisante pour des résultats fiables et reproductibles (Test spearman et test différentiel de Kruskal-Wallis).

Raffiner : Le suivi quotidien des animaux sera assuré par les zootechniciens compétents. Durant toute la période d'expérimentation, afin de limiter la souffrance des animaux, leur état général sera observé quotidiennement. Ainsi l'atteinte des points limites (état général de l'animal, perte de poids importante et taille de la tumeur développée) sera évaluée et des critères d'arrêt seront appliqués. Un enrichissement de type carré de coton sera rajouté aux animaux leur permettant ainsi de faire une nidification.

12622 Il a récemment été mis en évidence dans un modèle d'insuffisance cardiaque une désorganisation très précoce de l'architecture de la membrane du cardiomyocyte (CM) avec une perte des mitochondries sub-sarcolemmales (SSM) suivant l'induction d'une ischémie cardiaque. Ces anomalies précèdent la désorganisation et l'atteinte du système contractile et la survenue d'une insuffisance cardiaque et pourraient donc représenter les phénomènes initiateurs conduisant à l'insuffisance cardiaque.

Les questions qui se posent maintenant concernent 1/ la cinétique de disparition des SSM car si les données publiées montrent une disparition complète à 72h, il s'agit probablement d'un phénomène débutant quasi immédiatement après l'installation de l'ischémie 2/ la répartition exacte de ces anomalies car il a été observé que la perte précoce des SSM semble survenir dans tous les compartiments cardiaques, y compris à distance de la zone ischémique, et 3/ quel est le processus conduisant à la disparition des SSM. En effet, des résultats préliminaires indiquent qu'après ischémie, les membranes des CM présentent des bourgeonnements formant des vésicules qui se retrouvent dans l'espace intercellulaire, entre les CM ainsi que dans les vaisseaux du tissu cardiaque. Enfin, 4/ étudier l'impact de la perte des SSM sur la viabilité des cardiomyocytes et sur la fonction cardiaque.

Nous souhaitons donc répondre :

- Aux questions 1 et 2 chez 7 cohortes de 12 souris (6 subissant une ischémie cardiaque et 6 contrôles subissant une intervention fantôme sans ischémie) à différents temps après la chirurgie (30 min, 6h, 24h, 72h, 7 jours, 15 jours et 2 mois). L'analyse de la disparition des SSM et de la distribution tissulaire cardiaque des anomalies sera effectuée par microscopie électronique.

-A la question 3 en prélevant du sang avant et après installation de l'infarctus dans une cohorte de 12 souris (6 subissant l'ischémie cardiaque et 6 contrôles) afin d'analyser la présence potentielle de ces vésicules qui pourraient servir de biomarqueur de l'insuffisance cardiaque (mesures 24h avant l'ischémie puis 30min, 24h, 3 jours, 7 jours, 15 jours et 2 mois post ischémie)

- A la question 4 en mesurant l'impact de la perte des SSM 1/ sur la fonction cardiaque par échocardiographie et prélèvement sanguin (dosage de la troponine T) sur une cohorte de 18 souris (6 souris sauvages subissant l'ischémie cardiaque, 6 souris transgéniques n'exprimant pas une protéine de la membrane latérale du cardiomyocyte et chez qui les SSM sont absentes et subissant l'ischémie cardiaque et 6 souris transgéniques contrôles subissant une intervention fantôme sans ischémie), et 2/ sur la viabilité des cardiomyocytes en mesurant les taux d'apoptose (caspase 3 active) et de nécrose (score de nécrose mesuré par un anatomopathologiste) chez 5 cohortes de 12 souris (6 subissant l'ischémie cardiaque et 6 contrôles) à différents temps après la chirurgie (24h, 3 jours, 7 jours, 15 jours et 2 mois).

La taille initiale des 13 cohortes de 12 animaux et la cohorte de 18 animaux pourront être portée respectivement à 18 (9 contrôles et 9 subissant une ischémie cardiaque) et à 27 (9 souris sauvages subissant l'ischémie cardiaque, 9 souris transgéniques ne présentant plus de SSM et subissant l'ischémie cardiaque et 9 contrôles) en cas de besoin.

Compte tenu du taux de mortalité liée à l'ischémie cardiaque (50%) et à la chirurgie dans le groupe contrôle (environ 15%), le nombre total d'animaux utilisés au maximum dans ce projet sera de 348.

La règle des 3R sera appliquée dans ce projet :

Remplacer : Il n'existe pas à l'heure actuelle de moyens alternatifs pour l'étude de l'impact de l'infarctus du myocarde sur l'architecture du tissu cardiaque.

Réduire ; L'expérience a été organisée de manière afin de réduire au maximum le nombre d'animaux tout en prenant en compte la mortalité post-chirurgicale.

Raffiner L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptés à l'expérience et des potentiels effets indésirables des procédures sur leur état de santé global.

Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt pour éviter toute souffrance tout au long de la vie des animaux.

12623 Le nombre de patients atteints de maladies rénales chroniques et par conséquent en insuffisance rénale, est en constante augmentation au niveau mondial. Les causes primitives des atteintes rénales peuvent être multiples : métaboliques, hémodynamiques, immunologiques, ischémiques, mécaniques, toxiques, héréditaires ou infectieuses. Cependant, quelle que soit l'atteinte initiale, la majorité des néphropathies chroniques sont caractérisées par le développement d'une fibrose rénale. Lutter contre le développement de cette fibrose représente un enjeu majeur afin de limiter l'évolution vers l'insuffisance rénale. À l'heure actuelle, un grand nombre d'équipes cherchent à mettre en évidence les mécanismes impliqués dans le développement de la fibrose tubulo-interstitielle afin de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques qui permettraient de ralentir l'évolution vers l'insuffisance rénale.

L'obstruction urétérale unilatérale (Unilateral Ureteral Obstruction, UUO) chez la souris est un modèle d'étude particulièrement utilisé en recherche car il permet de mimer en accéléré la séquence complète de développement de la fibrose tubulo-interstitielle. Il s'agit d'une néphropathie d'origine mécanique (obstruction des voies urinaires par ligature d'un des deux uretères) caractérisée par une atteinte strictement tubulo-interstitielle.

La règle des 3R sera appliquée dans ce projet :

Remplacer Actuellement, les méthodes alternatives permettant une telle évaluation sont inexistantes. De ce fait, ce déficit rend incontournable le recours à l'expérimentation animale afin de valider de nouveaux candidats médicaments pour le traitement de la fibrose rénale et des néphropathies obstructives. Ce modèle expérimental présente des caractéristiques proches de celles retrouvées dans la fibrose rénale chez l'homme et est donc pertinent pour identifier et caractériser de nouvelles voies thérapeutiques, et pour tester de nouveaux candidats médicaments.

Réduire : Afin d'évaluer l'effet de candidats médicaments, des groupes expérimentaux de 12 souris mâles mâtures seront nécessaires pour d'obtenir des résultats reproductibles et fiables. Cependant, le nombre de groupes est dépendant du nombre de molécules et de doses à tester. C'est pourquoi, pour les cinq prochaines années 1020 animaux seront nécessaires.

Raffiner : Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit auprès de ces derniers. Pendant toute la durée des expérimentations (14 jours après chirurgie maximum), les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien afin de déceler l'apparition de points critiques tels que l'altération des fonctions normales (impossibilité d'uriner, de s'alimenter...), un comportement atypique (vocalisation, prostration, agressivité vis-à-vis de ces congénères), la présence d'une déshydratation et/ou perte d'appétit. L'apparition d'un ou de plusieurs de ces points critiques entrainera la mise en cage individuelle de l'animal afin de lui apporter les soins nécessaires et de le suivre pendant au moins 48h. Si son état ne s'améliore pas malgré nos soins, il sera euthanasié pour limiter toute souffrance. Les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de tapis chauffants thermo-régulés. A la fin des expérimentations, les animaux sont mis à mort afin de prélever les tissus d'intérêt pour les analyser.

12624 Alors que la relation entre le système immunitaire et le développement d'un cancer est un concept relativement ancien, l'immunothérapie constitue une des avancées majeures en cancérologie de cette dernière décennie. L'immunothérapie consiste à exploiter les propriétés du système immunitaire de l'hôte afin de détruire la tumeur. La stratégie la plus utilisée consiste à utiliser des inhibiteurs de point de contrôle (IPC), qui agissent en supprimant les signaux inhibiteurs de la réponse immunitaire. Malgré des résultats sans précédents, essentiellement parmi les patients atteints de mélanome, de cancer bronchique, ou de cancer de la vessie, la proportion des patients répondeurs reste relativement faible (de l'ordre de 30%). Par conséquent, il est fondamental d'élaborer des stratégies permettant d'amplifier l'efficacité de ces traitements. Nous nous intéresserons plus particulièrement au cancer bronchique, de par son incidence importante et de par son pronostic grave à un stade métastatique.

La radiothérapie constitue un des piliers de traitement de patients atteints de cancer localisé. A côté d'un mécanisme anti-tumoral direct des rayons contre les cellules cancéreuses aboutissant à leur mort, il a été rapporté dès les années 60, l'existence d'une réponse anti-tumorale à distance du site irradié, de façon exceptionnelle. Néanmoins, il a fallu près de 50 ans pour élucider partiellement ce mécanisme, désormais connu sous le nom d'effet "abscopal", et l'attribuer à un effet de la radiothérapie sur le système immunitaire. Depuis peu, il est désormais admis que l'effet pro-immunogène de la radiothérapie (capable de générer une réponse immunitaire contre la tumeur) est lié à plusieurs mécanismes : induction d'une "mort cellulaire immunogène" des cellules tumorales irradiées, libérant des molécules qui vont activer la réponse immunitaire ; afflux de cellules immunitaires par la production locale radio-induite de molécules d'intérêt ; modification du microenvironnement tumoral radio-induit (le microenvironnement étant constitué des cellules et molécules entourant les cellules tumorales, et pouvant avoir une action sur la tumeur) ; modification des marqueurs cellulaires des cellules immunitaires, modifiant leur fonctionnalité.

L'expérience clinique et préclinique suggère néanmoins que ces effets immunomodulateurs n'impactent que de façon mineure le devenir des cancers lorsque la radiothérapie est utilisée seule ; par contre, l'association de la radiothérapie et de l'immunothérapie (essentiellement par IPC) pourrait constituer une association synergique extrêmement prometteuse, permettant d'améliorer l'efficacité locale de la radiothérapie et/ou d'améliorer l'efficacité systémique de l'immunothérapie dans une situation métastatique.

Néanmoins, de nombreux mécanismes restent à élucider afin de créer une association radiothérapie et IPC réellement synergique et efficace.

Dans cette perspective, la question que nous nous posons est la suivante : y a-t-il des sites tumoraux plus propices que d'autres à générer un effet immunomodulateur lors de l'association radiothérapie-IPC dans le contexte d'un cancer broncho-pulmonaire ? Dans la mesure où ce type de cancer génère fréquemment des métastases cérébrales, nous nous intéressons donc aux différences, en termes d'effets immunomodulateurs, entre l'irradiation d'une métastase cérébrale et l'irradiation d'une lésion pulmonaire. Ceci permettrait d'optimiser l'effet immunomodulateur recherché lors de l'association radiothérapie - IPC. Nous utiliserons des souris dont le système immunitaire est compétent comme modèle d'étude. Nous implanterons les souris en profondeur avec des cellules murines cancéreuses au niveau pulmonaire et/ou au niveau cérébral (pour mimer une situation de métastase cérébrale).

La règle des 3R sera appliquée dans ce projet :

Remplacer Pour répondre à notre question, il est nécessaire d'évaluer l'ensemble des mécanismes immunitaires mis en jeu dans chaque cas, dans un système reproduisant la complexité globale du cancer et de la réponse immunitaire et comportant donc les tumeurs (irradiées ou non irradiées), leur microenvironnement (contenant les cellules immunitaires infiltrantes), et le système immunitaire (sang et organes lymphoïdes). Par conséquent, il n'est pas possible de remplacer le modèle d'étude in vivo, sur animal vivant.

Réduire : Afin de réduire le nombre d'animaux en expérimentation, une étude complète de la littérature actuelle concernant notre projet a été effectuée pour ne pas reproduire des résultats d'expériences déjà effectuées sur des animaux. Par ailleurs, nous utiliserons des tests statistiques

adaptés afin de valider nos résultats et limiter le nombre d'expériences à effectuer à 3, réduisant ainsi le nombre d'animaux. Le nombre total de souris utilisées sur 5 ans sera de 2684.

Raffiner : Nous porterons une attention particulière à la souffrance et au stress des animaux. L'utilisation d'analgésiques sera systématique pour diminuer la souffrance liée aux procédures expérimentales et au développement du cancer, associée à une anesthésie selon l'importance des douleurs pouvant être occasionnées lors des procédures. Les animaux seront manipulés avec précautions et calme durant toute la durée des expériences. Pour éviter le stress des animaux, le milieu environnemental et les conditions d'hébergement seront améliorés : cages agrémentées de tunnels ou « d'igloos » pour favoriser la stimulation sociale et physique ; alimentation enrichie etc...

Le suivi de l'état général des souris sera effectué quotidiennement par le porteur de projet et du personnel formé, basé sur l'observation des modifications de l'aspect physique de la souris et des modifications comportementales.

Nous serons particulièrement attentifs à la survenue chez l'animal d'un changement traduisant un point limite : seuil de douleur ou de détresse que l'on cherche à éviter, et traduisant une fin de vie proche. Ce sont essentiellement : une cachexie, des modifications comportementales, des modifications péjoratives de l'aspect physique, des troubles de la locomotion, des troubles de la respiration. Si un changement chez l'animal traduit un point limite, des critères d'arrêt seront appliqués et si nécessaire, l'animal sera euthanasié, en accord avec le vétérinaire désigné, afin d'éviter toute douleur ou toute détresse inutile.

12625 L'enjeu de cette étude est de tester une stratégie thérapeutique impliquant un modèle de souris atteint d'une maladie neurodégénérative rare (ataxie spinocérébelleuse 7, nommée aussi SCA7) dont l'issue est souvent fatale chez les patients atteints.

Cette maladie affecte principalement le système nerveux, tels que la partie antérieure du cerveau et la rétine. Des troubles à la marche et une perte d'acuité visuelle se développent à l'âge adulte et progressent inexorablement vers une issue fatale pour les patients. Cette maladie est causée par une protéine mutée, qui s'accumule anormalement au sein des neurones et devient toxique au cours du temps. D'autres maladies telle la maladie de Huntington, fonctionnent sur le même mécanisme ; c'est-à-dire l'accumulation de protéines mutées dans les neurones. A ce jour, aucun traitement ne permet de prévenir ou retarder la dégénérescence neuronale et l'apparition des symptômes de ces maladies.

Une stratégie thérapeutique proposée pour traiter ces maladies vise à stimuler les fonctions cellulaires normalement impliquées dans l'élimination des protéines, afin de prévenir l'accumulation et la toxicité des protéines mutées. Cette stratégie a récemment été testée dans un modèle de mouche de la maladie de Huntington ; en effet, en stimulant l'élimination des protéines avec une drogue spécifique, le phénotype neurodégénératif du modèle mouche de la maladie de Huntington a été amélioré. Le recueil et l'analyse de ces informations justifient de tester la stratégie thérapeutique sur un modèle souris à phénotype dommageable, comme celui de l'ataxie spinocérébelleuse 7.

En effet, il existe un modèle souris SCA7, qui récapitule bien les caractéristiques principales de la maladie humaine, incluant l'accumulation de la protéine mutée, l'atteinte visuelle et des défauts de motricité (l'ataxie). La grande similarité entre ce modèle de souris et la pathologie humaine en fait un modèle idéal pour tester des stratégies thérapeutiques pour soigner la maladie. Ce projet a pour but de démontrer chez un modèle de mammifère, que l'inactivation du gène A permet, à l'instar de l'expérience faite chez la mouche, de prévenir l'accumulation et la toxicité de la protéine mutée des souris SCA7. Le phénotype moteur (e.g. aux tests rotarod et champs ouvert) sera mesuré dans ces conditions, et il devrait s'améliorer, voire disparaître ; nous attendons donc un effet curatif partiel ou total. A terme, les résultats de cette étude auront pour valeur de stimuler le développement de la drogue pour un usage chez les souris modèles, et éventuellement chez les patients. L'approche pharmacologique qui a été utilisée pour traiter la mouche modèle de la maladie de Huntington n'est pas applicable pour un traitement des souris SCA7. Toutefois, comme alternative, nous pouvons mettre en place une approche génétique où les souris SCA7 seront croisées avec des souris

inactivées pour le gène A (qui sont viables et fertiles), et tester ainsi si le phénotype des souris SCA7 peut être amélioré.

La règle des 3R sera appliquée dans ce projet :

Remplacer : Pour étudier la pathophysiologie de cette maladie, nous avons obtenu un modèle de souris transgénique qui récapitule les caractéristiques principales de la maladie, ce qui en fait un modèle idéal pour tester nos hypothèses scientifiques et des stratégies thérapeutiques pour soigner cette maladie ce qui rend son remplacement par une méthode alternative impossible.

Réduire : L'utilisation de ce modèle est répandue dans le monde de la recherche, l'accès aux études publiées permet de réduire le nombre des animaux. Notre approche génétique va aussi permettre de réduire le nombre de souris nécessaires à notre étude. Ainsi nous croiserons les animaux des 2 lignées pour obtenir les 80 souris pour l'analyse

Raffiner : Les atteintes visuelles et motrices débutent à l'âge juvénile de la souris (vers 10 semaines d'âge) et progressent lentement sans altérer des comportements de base des souris, comme la prise de nourriture, jusqu'à l'âge de 30 semaines ; au-delà de cet âge certaines souris commencent à perdre du poids indiquant que leur santé se détériore. Ces informations nous permettent donc de restreindre et raffiner le protocole d'analyse avant l'âge de 30 semaines où l'état des souris SCA7 est normal bien qu'elles montrent un phénotype visuel et moteur léger et quantifiable expérimentalement. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12626 L'objectif global de cette étude est de développer une stratégie thérapeutique pour une maladie neurodégénérative rare à l'aide d'un modèle souris, qui récapitule les caractéristiques de la maladie. Cette étude se situe dans le domaine de la recherche translationnelle

L'ataxie spinocérébelleuse de type 7 cause principalement une dégénérescence des neurones du cerveau et de la rétine de l'œil. En conséquence, les patients souffrent de difficultés à la marche et d'une perte d'acuité visuelle, qui se développent à l'âge adulte et progressent inexorablement vers une issue fatale pour les patients. A ce jour, aucun traitement ne permet de prévenir ou retarder la dégénérescence neuronale et l'apparition des symptômes.

La maladie est causée par une protéine mutée, qui s'accumule anormalement au sein des neurones et cause leur mort. Les stratégies thérapeutiques envisagées visent à prévenir l'accumulation de cette protéine dans les neurones du cerveau et de la rétine.

Pour arriver à cette fin, nous allons utiliser une macromolécule nommée siRNA qui a comme propriété d'empêcher la synthèse de la protéine mutée dans la cellule. L'objet de cette étude est donc de déterminer dans quelle mesure le siRNA peut prévenir l'accumulation de la protéine mutée et améliorer le phénotype de souris modèle. A l'issue de cette étude, nous espérons pouvoir déterminer si le siRNA est suffisamment efficace pour suivre un développement en vue d'une thérapie chez les patients. Les traitements se feront par injection localisée de siRNA directement dans le cerveau et l'œil de la souris.

REMPLETER : La preuve d'efficacité de ce siRNA a été d'abord obtenue dans les cellules de patients cultivées en laboratoire ; dans ces conditions, le siRNA a été capable de réduire de façon significative l'accumulation de la protéine mutée dans les cellules. Pour démontrer le véritable potentiel thérapeutique de ce siRNA, il est dorénavant nécessaire de tester leur efficacité dans un modèle souris, qui récapitule fidèlement les caractéristiques de la maladie.

REDUIRE : Nous procéderons par étapes successives. Premièrement, nous optimiserons les protocoles d'administration. Deuxièmement, nous testerons différentes doses de siRNA et différents protocoles d'administration de façon ciblée à la fois dans le cerveau et la rétine de l'œil chez le même animal. Troisièmement, nous utiliserons les conditions les plus efficaces pour traiter les souris modèles au stade pré-symptomatique. Enfin, si le traitement pré-symptomatique s'avère efficace, nous effectuerons un traitement post-symptomatique, qui est plus adapté à la réalité d'un traitement chez les patients. Globalement, notre étude pourrait utiliser un maximum de 235 souris.

RAFFINER : Nous utiliserons le modèle souris qui récapitule le plus mieux la maladie humaine, incluant l'accumulation de la protéine mutée dans les neurones ainsi que les atteintes visuelles et motrices (l'ataxie). L'utilisation de ce modèle est rependue dans le monde de la recherche et aide à la conception d'essai préclinique. Par exemple, les atteintes visuelles et motrices débutent à l'âge juvénile de la souris (vers 10 semaines d'âge) et progressent lentement sans altérer des comportements de base des souris, comme la prise de nourriture, jusqu'à l'âge de 30 semaines ; au-delà de cet âge certaines souris commencent à perdre du poids indiquant que leur santé se détériore. Ces informations nous permettent donc de restreindre et raffiner les protocoles d'analyse. Notamment, les expériences sont entreprises avant l'âge de 30 semaines où l'état général des souris est bon bien qu'elles montrent un phénotype visuel et moteur léger et quantifiable expérimentalement.

Les injections auront lieu sous une anesthésie générale effectuée selon des protocoles préétablis par nos collaborateurs experts dans le domaine. Les personnes qui opéreront ces anesthésies possèdent déjà une habilitation à l'expérimentation animale et une expérience en anesthésie.

L'efficacité des traitements sera évaluée par des tests visuels et moteurs, selon des protocoles préétablis dans notre laboratoire, et par des études moléculaires et histologiques sur tissus des souris traitées, prélevés après leur euthanasie.

Nous anticipons que les traitements mèneront soit un effet bénéfique pour prévenir l'accumulation de la protéine mutée ou aucun effet. Des effets délétères du siRNA sont peu probables, comme le suggèrent plusieurs publications où le même type de macromolécules a été utilisé. Il est important de noter que ce type de stratégie thérapeutique est actuellement en phase clinique chez des patients atteints d'autres maladies. Au cas où notre siRNA causerait des effets délétères (par exemples : perte du poids, inactivité, souffrance), des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt. De façon générale, les souris seront surveillées quotidiennement et seront évaluées trois fois par semaine tout au long de la procédure expérimentale, afin d'identifier si les souris traitées ont un comportement anormal.

12627 Le virus Toscana (vTOS) est un arbovirus (Arthropod-Borne Virus) du genre phlebovirus qui a été identifié pour la première fois en Italie en 1971. Il a un tropisme exclusivement humain. La transmission se fait principalement par les phlébotomes (*Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus perfiliewi*). La distribution du virus est donc reliée à la présence ou non du vecteur avec un pic de circulation virale en été lorsque les populations de phlébotomes sont actives. La maladie peut revêtir différentes formes allant de symptômes relativement bénins à des formes sévères. La période d'incubation varie généralement de 3 à 7 jours mais peut aller jusqu'à 14 jours. Les symptômes sont principalement maux de tête, fièvre, nausée, vomissements et myalgie. De plus, l'examen physique des patients montre une rigidité au niveau de la nuque, le signe de Kernig (symptôme de méningite), des troubles de la conscience, des tremblements et des frissons. Cette première phase dure environ 7 jours et l'évolution est souvent favorable. Cependant, dans quelques rares cas, une forme sévère de la maladie peut se développer aboutissant généralement à une atteinte neurologique (encéphalite, méningo-encéphalite).

Le virus circule dans tout le pourtour du bassin méditerranéen et fait partie des 3 causes les plus probables de méningites dans le sud-est de la France durant l'été (avec les Entérovirus et les Herpes virus). Il n'existe ni traitement, ni vaccin pour lutter contre cette infection. Malgré la menace que représente cet agent pathogène, très peu d'intérêts lui sont portés d'où le manque de données et de connaissances.

L'absence de traitement et de prophylaxie efficaces pour lutter contre cet agent pathogène constitue une réelle menace et conforte l'importance de développer des modèles animaux afin de mieux comprendre la pathogenèse liée à ce virus. Au-delà d'une meilleure connaissance de la physiopathologie de l'infection par vTOS, la mise en place d'un modèle pourra par la suite permettre de tester de nouvelles molécules antivirales ou de nouveaux candidats vaccins contre ce virus.

Actuellement, très peu d'expériences sur modèle animal ont été menées concernant le vTOS. Une étude de 2003 a montré que des souris adultes BALB/c étaient sensibles à l'infection avec une souche virale humaine neuro-adaptée mais pas par inoculation sous-cutanée.

C'est pourquoi, dans ce projet, nous proposons de tester la sensibilité de différentes lignées de souris (C57/B6, IFNAR) à plusieurs souches de vTos (appartenant aux groupes A et B) à différentes doses, par différentes voies d'inoculation afin de développer un modèle animal pertinent. Cela nous permettra aussi de déterminer le schéma optimal d'infection pour l'étude du vTOS.

La règle des 3R sera appliquée dans ce projet :

Remplacer : Le virus ayant un tropisme uniquement pour les cellules neuronales humaines, il est difficile de se restreindre uniquement à des expérimentations in vitro. Il est donc nécessaire de mettre au point un modèle animal qui mimerait l'infection chez l'homme.

Réduire : Le nombre de souris proposé a été calculé de telle manière à ne recourir qu'à un minimum d'animaux pour que les résultats expérimentaux soient significatifs. Le projet prévoit donc le recours à un maximum de 576 souris provenant d'élevages autorisés sur 5 ans.

Raffiner : Ces animaux seront hébergés dans un environnement enrichi, et surveillés quotidiennement. Le suivi clinique des animaux sera réalisé tout au long des expériences et évalué grâce à une grille établie à partir de points limites précis, qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Lors des prélèvements, les souris seront anesthésiées à l'isoflurane pour éviter tout inconfort.

12628 L'activité physique (AP) est aujourd'hui reconnue comme ayant de nombreux bénéfices contre le cancer et est de plus en plus intégrée dans le suivi des patients. Des études épidémiologiques ont récemment montré que la pratique d'une AP chez les hommes atteints d'un cancer de la prostate (CaP) était associée à une amélioration de leur espérance de vie. De plus, notre laboratoire a montré que dans un modèle de souris, l'AP combinée à la radiothérapie (RT) permettait une plus grande infiltration de cellules immunitaires (cellules natural killers) et une plus grande mort des cellules cancéreuses par apoptose (ou mort cellulaire programmée). Ces résultats suggèrent donc que l'AP permet de sensibiliser les cellules cancéreuses à la RT, résultant en une meilleure efficacité de ce traitement.

Nous souhaitons à présent approfondir les processus moléculaires impliqués dans ces effets. L'épigénétique est un domaine en pleine expansion qui permet de mieux comprendre comment l'environnement peut influencer l'expression de nos gènes. Parmi les différents mécanismes épigénétiques on retrouve l'expression de micro ARNs. Les micro ARNs sont de petites molécules qui peuvent contrôler de nombreux processus cellulaires essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. Dans le cas de cancer, les micro ARNs sont de plus en plus étudiés pour leur implication dans le développement de CaP agressifs, mais également pour leur rôle dans l'efficacité de la RT et la réponse moléculaire de l'AP.

Nous faisons l'hypothèse que l'AP module l'expression d'un sous-ensemble de micro ARNs impliqués dans la radiorésistance des cellules CaP et par conséquent améliore l'efficacité de la RT. Cette étude a donc pour but de comparer le profil de micro ARNs de tumeurs prostatiques traitées avec de la RT seule ou en combinaison avec de l'AP.

C'est pourquoi nous avons prévu deux protocoles de cinq groupes de 15 animaux : (1) groupe d'animaux sains, (2) groupe cancer contrôle (sans traitement), (3) groupe cancer AP (roue d'activité placée dans la cage), (4) groupe cancer RT, (5) groupe cancer RT et AP.

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R.

- Remplacer : ce modèle expérimental in vivo est nécessaire pour comprendre les changements moléculaires induit par la combinaison de l'AP et de la RT. En effet, l'effet de l'AP notamment ne peut être remplacé par un modèle in vitro.

- Réduire : Le nombre d'animaux est choisi en fonction du nombre nécessaire permettant d'être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable pour valider les données obtenues à la

fin de la procédure. Dans notre étude, 150 souris mâles seront utilisées pour répondre à ces exigences statistiques.

- Raffiner : les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animal et assure le suivi quotidien. L'hébergement se fait dans des cages munies de jouets compatibles avec le modèle afin de minimiser le stress induit par l'hébergement. Le Raffiner est complété par une double surveillance journalière des animaux afin que les conditions de bien-être sont respectées. Des mesures seront mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales (notamment avec l'utilisation d'anesthésie, d'analgésie et de tapis chauffant). Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12629 Les femmes développent des réponses immunes plus importantes que les hommes, expliquant pourquoi les hommes souffrent davantage de pathologies infectieuses et qu'elles soient plus sévères que chez les femmes. En revanche, les femmes sont plus susceptibles de développer des maladies auto-immunes et des maladies allergiques. Paradoxalement, la grossesse peut améliorer des maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques (SEP) pour laquelle il existe un modèle chez la souris, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Il est important de comprendre ces effets paradoxaux. Nous concentrons nos études sur la sclérose en plaque (Axe 1), la pathologie respiratoire causée par le virus de la grippe (Axe 2) et l'asthme (Axe 3). Des différences de susceptibilité entre mâles et les femelles existent pour ces pathologies chez l'Homme et la souris.

Axe 1 : Pour comprendre comment la grossesse améliore la SEP, la souris représente un modèle de choix car l'administration de fortes doses d'œstrogènes inhibe le développement de l'EAE et nous disposons de plus de souris invalidées pour le récepteur aux œstrogènes alpha (REa) dans différents types de cellules immunes et pour différents éléments de signalisation du récepteur. L'identification des mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les œstrogènes inhibent l'EAE a comme but final de désigner des cibles thérapeutiques ou des analogues des œstrogènes permettant d'améliorer la SEP.

Axe 2 : Les infections par le virus de la grippe sont responsables d'une plus grande mortalité chez les femmes probablement du fait d'une réaction inflammatoire excessive dans le poumon. C'est pourquoi nous proposons d'identifier le rôle des œstrogènes dans ces infections en utilisant des souris invalidées pour REa dans les différents types de cellules immunitaires. Ceci pourrait avoir des implications par exemple en vaccination pour induire une réponse immunitaire suffisante mais non délétère.

Axe 3 : L'asthme est une maladie respiratoire chronique, plus fréquente chez les filles que chez les garçons. Nous testerons si les souris invalidées pour REa dans les différents types de cellules immunitaires sont susceptibles à l'asthme dans le but de déterminer les cellules et les mécanismes responsables de cette sensibilité accrue des femelles à l'allergie. Des canaux calciques présents sur des cellules immunitaires jouant un rôle clé dans l'asthme et les œstrogènes étant connus pour moduler leur expression et leurs fonctions, nous analyserons si la perte d'expression de ces canaux protège de l'asthme, ce qui pourrait faire de ces canaux une cible thérapeutique dans l'asthme.

La règle des 3R sera appliquée dans ce projet :

Remplacer Vu les effets complexes des œstrogènes et les enjeux thérapeutiques visant à diminuer ou amplifier la réponse immunitaire selon le contexte, il est nécessaire d'utiliser des modèles in vivo.

Réduire : Comme l'encéphalite peut être source de douleurs sévères, nos protocoles visent à réduire la sévérité de l'EAE et la durée des symptômes ainsi que le nombre d'animaux utilisés. Nous tentons aussi de maximiser les paramètres étudiés pour limiter le nombre d'animaux. Le nombre maximum de souris sera de 5252 souris sur 5 ans

Raffiner : Nous assurons l'accès à la nourriture même chez les animaux paralysés. Nous avons défini des points-limites et des critères d'arrêt afin de limiter l'altération des conditions de vie..

12630 La mémoire de travail est un type de mémoire qui nous permet de retenir et de manipuler une quantité limitée d'informations pendant un temps relativement court. Elle nous permet de stocker ces informations durant quelques secondes tout en exécutant d'autres tâches. Ce type de mémoire nous permet ainsi par exemple de prendre des notes écrites durant une présentation orale. La mémoire de travail joue un rôle important dans l'apprentissage, comme l'apprentissage d'une langue, et dans différents types d'activités comme la lecture et la résolution de problèmes. Ce type de mémoire implique différentes régions cérébrales qui interagissent entre elles. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, un déficit de la communication entre ces régions cérébrales entraîne une détérioration de la mémoire de travail. L'étude de l'interaction entre ces différentes aires est donc importante pour comprendre son fonctionnement dans un cerveau sain mais également dans les pathologies associées. L'objectif de ce projet est d'étudier finement au niveau des neurones comment les informations provenant de différentes aires cérébrales sont traitées. Nous utilisons des approches d'enregistrement de l'activité *in vitro*, l'électrophysiologie, pour mesurer les courants électriques qui permettent aux neurones de communiquer entre eux chez la souris. Cette espèce de mammifère, facile à élever et à reproduire dans des conditions contrôlées, est très utilisée en neurosciences car l'organisation de leur cerveau est proche de celle du cerveau de l'homme. Les animaux auront préalablement subi une chirurgie cérébrale pour exprimer des molécules sensibles à la lumière, les opsines (technique d'optogénétique), pour activer de manière sélective certaines connexions qui innervent une zone cérébrale centrale pour la mémoire de travail, le cortex pariétal postérieur. Après prélèvement des cerveaux, la force des connexions neuronales et les mécanismes de traitement de l'information seront étudiés ce qui nous permettra de progresser dans la connaissance de la physiologie de la mémoire de travail.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet à ce jour il n'existe pas encore de méthodes alternatives, l'étude de la communication entre différentes aires cérébrales nécessite l'utilisation d'un cerveau intact.

Réduire : ce projet utilisera 200 souris C57BL6/J durant 2 ans. Nos groupes expérimentaux seront dimensionnés pour utiliser le plus petit nombre possible d'animaux tout en obtenant des statistiques solides.

Raffiner : nous soulagerons les douleurs générées durant les chirurgies en administrant les molécules antalgiques les plus adaptées. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur vie avec une surveillance quotidienne par du personnel compétent. Ils auront accès en permanence à l'eau et à de la nourriture de qualité constante, préparée spécifiquement pour leurs besoins physiologiques. Ils seront hébergés en groupe sociaux dans des hébergements enrichis avec des éléments qui leur permettront de reproduire leurs comportements naturels. Dans le cadre de leur suivi quotidien comme au cours des procédures, des points limites seront définis pour éviter ou limiter toute souffrance.

12631 L'étude et la compréhension des mécanismes cellulaires impliquent souvent de provoquer la dérégulation d'un gène et d'observer les conséquences qui en découlent. Si un gène identifié est inconnu, le modifier ou le dérégler, observer les conséquences permet de recueillir et de nouvelles données sur son rôle et sa fonction. Si des informations obtenues lors de l'étude de pathologies, humaines par exemple, nous indiquent un lien possible entre gène et pathologie, une ou des modifications ciblées de ce gène peuvent permettre de créer un modèle d'étude de cette pathologie en la mimant tout ou en partie. Si ces données peuvent être recueillies avec des approches « *in vitro* », elles doivent être validées et complétées ensuite par une approche dite intégrative dans un organisme vivant. Cette étape qu'est l'expérimentation animale offre une vision globale des interactions au sein d'un organe, d'un organisme au cours de sa vie ou au cours du développement d'une pathologie. La reproduction de ce dérèglement chez l'animal permettra de disposer d'un « modèle » pour l'étude d'un gène ou d'une pathologie avec la recherche de traitement. La souris est une espèce de choix pour ce type de recherche. Ce mammifère dont la physiologie, la reproduction, la génétique sont bien connues, est surtout l'une des rares espèces pour laquelle il est possible de modifier aisément le génome avec une transmission de cette modification d'une génération à l'autre.

Cet animal permettra d'établir une lignée de souris transgénique. Sa reproduction rapide et la facilité à l'élever et la maintenir en captivité permettent des études sur des événements statistiquement rare (ex. cancer). Enfin la possibilité de croiser différentes lignées permet des études complexes avec des animaux porteurs de plusieurs modifications sans recourir à de nouvelles modifications en laboratoire. Leur création nécessite un investissement scientifique très important tant en terme de moyens humains et technologiques que de temps (2 ans). Ces animaux sont élevés dans un environnement sanitaire dit protégé, c'est-à-dire qu'ils sont mis à l'abri de tout risque de maladies qui pourraient leur être naturellement préjudiciables mais aussi fausser les résultats des études effectuées. La cryopréservation des gamètes de ces animaux permet de ne maintenir vivantes que les lignées en cours d'études, tout en les conservant à l'abri des risques sanitaires. Comme chez l'humain et les animaux de rentes, des cellules germinales (sperme ou ovules fécondés) sont congelées dans de l'azote liquide. Leur réveil ou reviviscence passera, pour le sperme par l'emploi de la Fécondation In Vitro (FIV) d'ovules, pour les ovules fécondés par une simple décongélation. Dans l'ensemble des cas, les ovules fécondés obtenus seront réimplantés dans des mères porteuses. Un autre avantage de ces techniques est de décontaminer une lignée. En effet, si une lignée de souris est porteuse de pathogènes naturels, elle ne peut être installée dans une animalerie protégée sans faire courir de risque à l'ensemble du cheptel et aux projets scientifiques. Récolter du sperme ou des ovocytes de ces animaux ayant des pathogènes et l'introduire stérilement dans une mère porteuse sans pathogènes rendra cette lignée propre et lui permettra d'être installée en animalerie protégée. L'objet de ce projet est déclarée l'activité d'un nouveau service de cryopréservation installé dans une nouvelle animalerie au statut sanitaire protégé. L'objectif de ce service est de permettre :

- a) de cryo-préserver l'ensemble des lignées murines de la communauté scientifique afin de les protéger de tout accident sanitaire, de pouvoir proposer, une prise en charge systématique des lignées murines arrivant dans les animaleries du site universitaire pour protéger leur patrimoine génétique et les décontaminer afin de peu à peu garantir un environnement sanitaire général de qualité, limitant les contaminations croisées entre animaleries. (Réduire et Raffiner)
- b) de limiter la population murine en ne maintenant vivantes que les lignées impliquées dans des projets de recherche. (Réduire)
- c) en employant la FIV comme technique de reproduction assistée, il est possible de générer rapidement un nombre important de nouveau-nés. La stimulation hormonale de femelles produit massivement des ovocytes. La récolte de ces ovocytes fécondés par FIV à partir de sperme permet leur réimplantation dans des mères porteuses pseudogestantes. Cette technologie permet de passer rapidement du stade congelé au stade respirant sans une amplification lente de la colonie. Cette approche est particulièrement utile pour des lignées présentant des phénotypes dommageables impactant leur survie et leur fertilité. (3R).
- d) de simplifier les collaborations scientifiques en transportant des gamètes congelés plutôt que des animaux vivants. (3R).

Le fonctionnement de ce service sur 5 ans conduira à la préservation d'environ 300 lignées et nécessite l'emploi de 6568 souris grâce à 3 procédures : i) l'injection IP d'hormones pour obtenir une stimulation hormonale de femelles pré pubères pour obtenir une superovulation (douleur légère) (4608 souris) : ii) par la vasectomie de male (douleur modérée). Un male vasectomisé est stérile mais conserve son comportement reproducteur. Il s'accouplera, cet acte provoquera chez la femelle, la maturation de l'utérus en vue d'une gestation (280 souris). La femelle est dite alors pseudo-gestante iii) la réimplantation (douleur modérée) par introduction d'ovocytes dans l'oviducte des femelles pseudogestantes via une incision abdominale (1680 souris) Ces deux dernières procédures sont faites sous anesthésie avec une couverture antalgique adaptée et un suivi post opératoire strict. Des points limites suffisamment prédictifs et l'utilisation de critères d'arrêt permettront d'éviter toute souffrance inutile.

Les technologies de transgénèses chez le rat prennent de l'essor depuis peu permettant de générer des modèles transgéniques avec cette espèce. Bénéficiant de l'expertise nécessaire à la conservation de ces nouvelles lignées et de l'ensemble des considérations développées précédemment, ce projet peut être étendu aussi au rat. Nous prévoyons d'utiliser 386 rats (192

rattes pour la super ovulation, 50 rats vasectomisés et 144 rattes à réimplanter). Le nombre total d'animaux sera donc de 6954.

12632 Quand il devient chronique et/ou excessif, le stress peut mener à un mal-être, à des situations extrêmes de souffrances (burnout, dépression, anxiété, troubles de stress post-traumatique) qui, dans leurs expressions pathologiques, forment les troubles anxiodépressifs. Ils représentent les troubles neuropsychiatriques les plus fréquentes et sont la cause la plus importante d'invalidité dans le monde. Leur prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et il s'agit de la famille de pathologies la plus coûteuse notamment en raison de leur persistance et de leurs coûts indirects (50% des arrêts maladies en Europe sont dus au stress et aux troubles associés). Ces troubles sont généralement traités par des pharmacothérapies basées sur l'administration d'antidépresseurs. Toutefois, si ces traitements sont efficaces pour une partie des patients (jusqu'à 50%), ils le sont peu chez une proportion importante de patients (insensibilité partielle ou totale). Ainsi, le stress et les troubles associés posent un problème majeur de santé publique, nécessitant une meilleure compréhension des mécanismes neurobiologiques sous-jacents et la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces. Dans ce cas, des traitements alternatifs sont proposés comme les techniques de neurostimulation du cortex préfrontal. Mais les mécanismes par lesquels la rémission survient restent inconnus.

Ainsi, notre projet s'inscrit dans un programme de recherche visant à comprendre ces mécanismes. Nous avons précédemment identifié le cortex préfrontal comme une structure clé. Toutefois les circuits cérébraux sous-tendant ce contrôle n'ont pas encore été caractérisés. On suppose que les effets surviennent via les connexions du cortex préfrontal vers l'hippocampe et l'amygdale, mais ces circuits sont insuffisamment décrits.

Ainsi le but des procédures décrites dans cette saisine sera de caractériser chez la souris ces circuits à travers des techniques de traçage. La souris est un mammifère dont les structures cérébrales présentent une forte homologie avec l'homme, et donc une espèce animale appropriée pour étudier les circuits cérébraux.

Cette étude s'appuie sur le principe des « 3R » :

Remplacer : L'identification précise des circuits cérébraux peuvent uniquement être réalisées dans des cerveaux entiers et chez des organismes vivants.

Réduire : Les effectifs sont optimisés et réduits en tenant compte de la variabilité comportementale interindividuelle, de celle due aux injections/implantations intracérébrales afin d'avoir une puissance statistique suffisante. L'effectif total maximum pour la totalité du projet de cette saisine est de 60 souris.

Raffiner : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu avec une surveillance quotidienne. Pour Les injections intracérébrales, les animaux recevront un traitement analgésique avant, après et 24-48 H suivant l'intervention, puis si nécessaire un traitement antibiotique. Pendant la chirurgie, chaque animal est placé sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Les injections intracérébrales seront réalisées par des chercheurs formés et expérimentés. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12633 Le mélanome cutané est le plus grave des cancers cutanés. Alors qu'il ne représente que 3 à 5 % des cancers cutanés, il est responsable de près de 80 % des décès dus à ces derniers. Le développement des thérapies ciblées a considérablement amélioré la prise en charge du mélanome métastatique. Cependant, la majorité des patients rechutent sous traitement suggérant l'émergence de mécanismes de résistances. L'étude de ces mécanismes est donc primordiale afin de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans ce contexte, nous avons trouvé une nouvelle

cible thérapeutique et nous devons tester son traitement en co-traitement avec les thérapies existantes chez la souris, modèle récapitulant au mieux la pathologie humaine.

Notre projet fait appel à l'expérimentation animale tout en respectant la règle de 3R :

Remplacer : Les animaux ne sont utilisés que quand ils ne peuvent être substitués par des modèles *in vitro* de cellules en culture ou d'organes isolés. En effet l'étude chez l'animal permet spécifiquement la prise en compte le rôle de l'environnement tumoral, la dissémination métastatique ainsi que les variabilités inter- et intra-individuelles sur la pharmacologie des médicaments.

Réduire : Le nombre maximum d'animaux utilisés dans cette étude sera de 240 souris, pour avoir des résultats analysables statistiquement.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans des conditions qui répondent à la fois à la réglementation nationale et aux directives européennes dans le domaine de l'expérimentation et l'éthique animale. Le bien-être des animaux sera pris en compte. L'enrichissement sera prévu pour l'hébergement (igloos, morceaux de bois à grignoter, sopalin, tunnels et sizzle-nest). Les animaux seront manipulés par un personnel qualifié avec précaution durant toute la durée de l'expérience, pour réduire le stress. Les animaux seront surveillés quotidiennement afin de repérer précocement les signes de souffrance (comportement, suivi du poids, pelage...). Dès que les signes suivants seront observés : - perte de poids de 20% en 48h - difficultés à respirer - prostration - dos voûté les animaux seront euthanasiés. Le point limite ultime sera une taille de 2 cm³ pour les tumeurs sous cutanées.

12634 Un précédent projet concernait la caractérisation d'une souris très immunodéficente utilisée comme modèle animal dans la leucémie aiguë myéloïde de l'homme où seules des souris de sexe masculin ont été étudiées et nous avons réussi à établir les intervalles de référence hématologiques, biochimiques et cytologiques de la souris NSG mâle. Afin de compléter la caractérisation de cette souche de souris immunodéficente et compte tenu du fait que les deux sexes réagissent différemment à la prise de greffe de leucémie, il est nécessaire de compléter le précédent projet sur des animaux de sexe féminin en établissant les valeurs normales de concentration des différents composants du sang ainsi que de caractériser la composition de leur moelle osseuse.

Notre projet fait appel à l'expérimentation animale tout en respectant la règle de 3R :

Remplacer : Pour cette étude, le remplacement n'est pas envisageable car nous avons besoin de caractériser la souche NSG.

Réduire : cependant, nous avons pris soin de réduire au maximum le nombre d'animaux prévus, soit 20 souris, nombre minimum pour pouvoir définir les valeurs normales que nous recherchons.

Raffiner : Les souris incluses dans notre étude devront présenter toutes les caractéristiques d'un animal "normal" et donc en bonne santé. Les souris seront hébergées dans une animalerie dédiée par groupe de 5 maximum dans des cages agrémentées de tunnels ou d'igloos pour que les animaux aient une meilleure stimulation sociale. Ces conditions d'hébergement répondent à la fois à la réglementation nationale et aux directives européennes dans le domaine de l'expérimentation et de l'éthique animale. De plus, une personne est spécifiquement dédiée au bien-être des animaux. Dans un souci de Raffiner des procédures, les prélèvements sanguins sur animaux vivants se feront sous anesthésie générale avec des marqueurs précoces de réveil et/ou de douleur (principalement l'augmentation de la fréquence respiratoire) afin d'assurer aux animaux une narcose suffisante pour qu'il n'y ait pas de douleur ressentie. La fin de la procédure est marquée par l'euthanasie des animaux sous anesthésie générale sans réveil préalable. Cette euthanasie est inévitable compte-tenu du volume sanguin qui est nécessaire pour notre étude et qui est totalement incompatible avec le réveil des animaux. Les souris de notre étude ne subiront donc aucune procédure sans anesthésie générale, autre que le transfert de leur cage à la boîte d'anesthésie. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12635 La cécité est un problème de santé publique handicapant gravement les personnes atteintes et concerne un français sur mille. Parmi les causes de cécité, les neuropathies optiques liées à des mutations du gène OPA1 (OPONs, OPA1-linked Optic Neuropathies) affectent 25 000 personnes en Union européenne. Ces neuropathies optiques constituent un groupe de pathologies neurodégénératives héréditaires incluant l'atrophie optique autosomique dominante (adOA, autosomic dominant optic atrophy) ou maladie de Kjer et l'adOAplus (syndrome de Behr). L'adOA, maladie oculaire rare ($1/12000 < \text{prévalence} < 1/50000$) à l'occurrence précoce (deux premières décennies de vie) et à évolution lente, est marquée par une perte de vision bilatérale indolore mais progressive résultant d'une dysfonction et d'une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine et de leurs axones constitutifs du nerf optique. L'adOAplus présente un spectre clinique étendu pouvant inclure une perte auditive, une ataxie cérébelleuse, des neuropathies périphériques et des déficits neuromusculaires. Les OPONs sont causées par des mutations au sein du gène nucléaire OPA1 codant pour une GTPase mitochondriale de la famille des dynamines, ancrée à la membrane interne mitochondriale et jouant un rôle central dans la dynamique mitochondriale (fusion), la stabilisation des crêtes mitochondriales et l'organisation de la chaîne de transport des électrons. Un déficit en OPA1 induit une fragmentation du réseau mitochondrial, une instabilité de l'ADN mitochondrial, un excès de mitophagie et d'apoptose. L'haploinsuffisance (sous-expression) d'OPA1 est considérée comme le principal mécanisme pathologique des OPONs, étayée par diverses preuves génétiques telles qu'un excès de mutations perte de fonction, des délétions complètes, une Réduire protéique d'OPA1 dans les fibroblastes dérivés de patients et au sein de biopsies.

Aucun traitement ou thérapie ne sont actuellement disponibles. Les approches de thérapies géniques conventionnelles, supplémentant l'ensemble du gène muté, sont limitées par la présence de variants d'OPA1, issus d'un mécanisme d'épissage alternatif, et, régulant finement par un dosage approprié, les mécanismes de fission/fusion mitochondriale. Si la sous-expression d'OPA1 amène à l'haploinsuffisance, sa surexpression est toxique, justifiant le besoin d'un juste équilibre. La stratégie de ciblage par la technique SMaRT (Spliceosome-Mediated RNA TransSplicing) représente une méthode novatrice pour la correction spécifique de chacun des transcrits mutés du gène OPA1. Cette approche thérapeutique s'inscrivant dans la continuité des travaux effectués au laboratoire a fait l'objet d'une réflexion approfondie et surmonte les limitations actuelles de thérapie génique par supplémentation complète du gène OPA1. Reposant sur l'hybridation et le trans-épissage entre un ARN pré-messager correctif avec l'ARN endogène muté, générant ainsi un ARN chimérique, elle permet de cibler spécifiquement et de rehausser de manière endogène le niveau d'expression de l'ensemble des transcrits du gène OPA1 sans modification irréversible du génome nucléaire. Cette approche thérapeutique, déjà validée pour d'autres pathologies génétiques (épidermolyse bulleuse, hémophilie, cardiomyopathie hypertrophique, dystrophie musculaire, rétinite pigmentaire, cancer de la peau) permet de surmonter les limites actuelles des approches conventionnelles de thérapie génique et constitue l'approche idéale pour l'adOA.

Nous testerons un nouveau traitement applicable à l'adOA reposant sur une injection unique intraoculaire (intravitréenne) chez la souris d'adénovirus associé, spécifique des cellules ganglionnaires de la rétine contenant un plasmide codant pour l'ARN correctif spécifique des différents transcrits du gène OPA1. L'objectif de ce projet est la caractérisation de modèles animaux de la pathologie et l'étude des effets d'une thérapie génique, ciblant les différents transcrits (ARN pré-messagers) du gène OPA1 endogène muté, sur le remodelage rétinien (nombre de cellules ganglionnaires et projections des axones constitutifs du nerf optique), ses conséquences sur la morphologie et la fonction mitochondriale et sur le recouvrement du comportement visuel. Les effets tissulaires seront évalués chez l'animal par examen du fond d'œil et par tomographie à cohérence optique. Le comportement des animaux sera évalué par un test optomoteur non-invasif et prédictif d'une restauration visuelle. Ce test permettra de visualiser les effets in vivo du traitement au cours du temps, en considérant l'animal dans son ensemble.

Notre projet fait appel à l'expérimentation animale tout en respectant la règle de 3R :

Remplacer : Les procédures expérimentales chez l'animal ont un caractère de stricte nécessité ne pouvant pas être remplacées par d'autres méthodes n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants

et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. L'animal dans son entité est la seule alternative à l'évaluation de la restauration visuelle.

Réduire : Pour cette étude, un total de 600 souris mâles et femelles sera utilisé. Ce nombre estimatif est nécessaire pour l'obtention de résultats comportementaux statistiquement significatifs sans compromettre ni reproduire de manière injustifiée la présente étude. Si de bons résultats sont obtenus rapidement, un nombre d'animaux inférieur aux prédictions sera utilisé. Les animaux ne remplissant pas les critères (échecs interventionnels, thérapeutiques), serviront aux étudiants pour s'entraîner aux dissections, coupes et marquages après leur mise à mort.

Raffiner : L'injection oculaire sera effectuée en condition d'asepsie optimale avec contrôle permanent de la température et du seuil de douleur de l'animal. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12636 L'utilisation d'hormones pour stimuler la fonction ovarienne dans le but de collecter des ovocytes en vue d'une procréation médicalement assistée (PMA) est une pratique clinique courante pour aider les couples ayant des problèmes de fertilité. L'une des complications, rare mais grave, constitue un syndrome d'hyperstimulation ovarienne (OHSS, Ovarian hyperstimulation syndrome). Cette pathologie est liée à une réponse anormale aux hormones qui conduit à la formation de foyers hémorragiques inflammatoires au niveau de l'ovaire. A l'heure actuelle, il existe très peu d'éléments qui permettent d'expliquer la survenue de ce syndrome et surtout aucun marqueur prédictif de cette réponse chez la femme. Notre équipe a identifié les récepteurs aux oxystéroïdes (LXRs) comme des acteurs potentiels de cette pathologie chez la femme. Nous disposons de modèles de souris qui reproduisent les signes cliniques de l'OHSS. Nous souhaitons ainsi mettre à profit ces observations pour mieux comprendre l'origine de ce syndrome et surtout savoir si ces récepteurs pourraient constituer des marqueurs prédictifs voir même des cibles thérapeutiques.

Trois lots de souris seront utilisés, des souris sauvages ("normales"), des souris transgéniques porteuses d'une délétion des gènes Nr1h2 et Nr1h3 codant respectivement LXRalpha et beta, et enfin, des souris transgéniques équivalente au lot précédent mais pour lesquelles, un sauvetage de l'expression de LXRbeta a été conduite à l'aide d'un driver ciblant son expression dans les cellules de la granulosa ovarienne. Ces animaux recevront un protocole standard pour déclencher une superovulation à savoir une injection IP de PMSG (Prégnant Mare Serum Gonadotrophin) le jour 1 puis une injection d'hCG (human Chorionic Gonadotrophin) le jour 3. Un total de 270 animaux sera nécessaire pour conduire cette étude. Afin de respecter au mieux la règle des 3R,

Remplacer : L'étiologie de l'OHSS est très peu connue, l'accès au tissu ovarien humain est très rare. Ainsi, l'exploration phénotypique et la caractérisation des dysfonctionnements moléculaires de ces 2 modèles transgéniques constitue une opportunité majeure pour comprendre l'apparition de ce syndrome et nécessite donc le recours à l'animal.

Réduire : les lots expérimentaux de souris ont été établis pour limiter un maximum le nombre d'animaux utilisés tout en respectant les nécessités liées à la puissance statistique de l'étude. Le recours aux modèles animaux sera limité par l'utilisation de modèles cellulaires qui permettra de déterminer les fenêtres optimales d'analyses de réponse aux hormones. Une attention toute particulière sera apportée au bien-être de l'animal durant le protocole.

Raffiner : Le protocole de stimulation hormonale constitue une expérimentation qui va entraîner du stress léger chez l'animal puisqu'il représente seulement deux injections par voie IP. Toutefois, les animaux en particulier les lignées transgéniques peuvent répondre de manière « exagérée » au traitement hormonal. De fait, ces lots de souris seront suivis avec une fréquence observationnelle plus élevée (deux fois par jour) pour détecter toute manifestation de mal-être ou de souffrance. Aucun traitement antalgique ne pourra être réalisé car il conduira de facto à modifier les paramètres de réponse de l'ovaire à la stimulation hormonale (en particulier les anti-inflammatoires). La sortie de l'animal de l'étude sera donc essentiellement basée sur l'observation des points limites (isolement et indifférence au milieu extérieur, modifications des périodes de sommeil avec une hyperactivité en période diurne, dos voûté, yeux enfoncés, pelage mal soigné). Si l'un ou plusieurs de ces critères sont observés, la gravité des signes et l'état global de l'animal seront évalués par le

responsable de l'expérimentation et/ou le responsable du SBEA pour décider si nécessaire de l'euthanasie de l'animal.

12637 Le présent projet vise à caractériser anatomiquement et biomécaniquement la marche bipède chez le babouin olive (*Papio anubis*) en utilisant des méthodes expérimentales non invasives. L'objectif principal est de développer un outil d'aide à la décision (Decision Support System, DSS) pour les anatomistes et paléoanthropologues afin de reconstruire des anatomies plausibles pour les espèces d'hominines fossiles à partir de vestiges fragmentaires et de simuler des marches bipèdes plausibles pour ces espèces compte-tenu de leur anatomie. L'expérimentation proposée ici vise à apporter les données comparatives nécessaires à la validation de ce DSS, par l'analyse fonctionnelle de modèles vivants éloignés morphologiquement de l'homme. La faisabilité technique de l'expérimentation proposée a été validée lors d'un projet précédent. Le présent projet qui est sa suite logique a pour objectif de déterminer les fondements anatomiques et moteurs (contrôle moteur) de la marche bipède et de la transition de la quadrupédie à la bipédie

Concernant l'acquisition des données cinétiques et cinématiques, les animaux seront entraînés par des techniques de renforcement positif à accepter le positionnement des électrodes de surface (i.e. Electromyographie (EMG) de surface et sans fil) et à marcher à deux et quatre pattes sur un tapis roulant à vitesse constante. Cet entraînement permettra de raffiner les procédures. Pendant ces sessions, les mouvements et l'activité musculaire des animaux se déplaçant librement seront enregistrées.

Règle des 3R

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

Réduire : Le projet compte un échantillon de 4 babouins olives (2 adultes et 2 jeunes), intégrant pour les 2 jeunes un suivi individuel de 4 ans réduisant au maximum le nombre d'individus impliqués dans le projet.

Raffiner : Les données anatomiques utilisées dans cette étude seront collectées grâce à une méthode non-invasive (Scanner) permettant de raffiner les procédures. Les seuls gestes invasifs effectués sur les animaux au cours de ce projet se résument aux anesthésies (par voie intramusculaire) nécessaires pour 1) l'instrumentation des animaux (positionnement des électrodes en surface + marqueurs rétroéclairés) lors de la marche contrôlée des animaux et 2) la prise d'images lors des scanners. Aucune mesure analgésique n'est prévue lors de l'exécution de ces gestes. L'anesthésie est nécessaire pour améliorer la précision de positionnement des électrodes et des marqueurs, ainsi que pour réduire le stress de l'animal lié à la contention/immobilisation sur plusieurs minutes

12638 L'ostéoporose est une maladie qui affecte plus de 200 millions de femmes dans le monde et qui survient lorsqu'il existe un déséquilibre entre la formation et la résorption osseuse. Cette maladie est caractérisée par une perte excessive de la masse osseuse ce qui aboutit à une diminution de la résistance osseuse et donc à une augmentation du risque de fracture.

Les cellules souches de la moelle osseuse sont la source majeure de précurseurs ostéoblastiques qui sont les cellules à l'origine de la formation osseuse. Les mécanismes impliqués dans la différenciation des cellules souches en ostéoblastes ne sont que partiellement connus.

Le but de ce projet est de caractériser des protéines qui favorisent la différenciation des cellules souches en ostéoblastes et donc favoriserait la formation osseuse. Dlx5 et Dlx6 sont notamment deux protéines qui sont exprimées par les cellules souches et qui sont impliquées dans la différenciation des ostéoblastes. L'objectif est de mieux comprendre leurs rôles dans la différenciation ostéoblastique et d'identifier des partenaires qui pourraient devenir des cibles thérapeutiques en favorisant la formation osseuse.

Pour cela, nous étudierons dans un premier temps, l'effet de l'absence de Dlx5 et Dlx6 chez la souris sur le remodelage osseux. Il sera nécessaire d'injecter des molécules fluorescentes (tétracycline et calcéïne) permettant de visualiser la formation de l'os. Un recueil d'urine sera

effectué afin de doser des protéines qui reflètent la résorption osseuse. Différents échantillons seront prélevés pour quantifier le taux de formation et de résorption osseuse.

Ces interventions sont réalisées dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer : Le recours à l'animal dans ce projet est indispensable car nous souhaitons identifier dans un système biologique complet l'impact sur l'architecture osseuse de la délétion de Dlx5 et Dlx6 dans des progéniteurs ostéoblastiques.

Réduire : Les effectifs ont été ramenés au minimum permettant toutefois d'avoir un effet statistique significatif. La veille de la mise à mort, les organes non prélevés des animaux sauvages pour cette procédure seront proposés à d'autres expérimentateurs pour éviter la mise à mort d'autres animaux. D'après des calculs statistiques, nous pensons utiliser au maximum 216 souris sur 4 ans pour l'ensemble de ce projet.

Raffiner : Les animaux seront hébergés en présence d'enrichissement (maisonnette, tunnel, bâton à grignoter). Les procédures de ce projet sont toutes des procédures légères qui n'induisent aucune souffrance, ou minime. Néanmoins, pour veiller au respect du bien-être animal, les gestes d'injection et de ponction seront effectués par du personnel qualifié. Bien qu'aucune souffrance ne soit attendu, le poids des animaux sera surveillé afin de garantir leur bien-être. Leur comportement et leur interaction sociale sera surveillé afin de veiller au bien-être animal. En cas d'atteinte des points limites ultimes, les animaux seront mis à mort afin d'éviter toute souffrance.

12639 La radiothérapie est l'une des méthodes les plus efficaces et les plus utilisées pour traiter les cancers. Au moins 70 % des patients atteints d'un cancer seront traités par radiothérapie durant leur maladie. Le principal défi de la radiothérapie est de parvenir à déposer une dose curative dans la tumeur tout en s'assurant que les tissus sains environnants soient préservés dans leur intégrité. Ceci est d'autant plus crucial pour les tumeurs radiorésistantes comme les gliomes (tumeurs cérébrales), qui sont actuellement traitées uniquement de façon palliative. Dans ce contexte, notre objectif principal s'inscrit dans l'amélioration des traitements de radiothérapie. Pour ce faire, nous explorons de nouvelles approches et nous proposons de développer des techniques innovantes utilisant de nouvelles modalités de traitement. Dans le cadre de ce projet, nous nous focaliserons sur l'une de ces techniques innovantes qui a montré dans des études préliminaires un intérêt significatif dans la préservation des tissus sains (même à des doses très élevées) ainsi qu'un effet très intéressant sur le contrôle de la croissance tumorale chez le rat.

Ces études seront complétées au sein de notre structure pour valider l'efficacité de cette nouvelle technique de radiothérapie en comparaison à celle utilisée actuellement chez le patient.

Respect de la règle des 3R.

Remplacer : Nos critères d'évaluation pour l'efficacité de la technique vont porter sur la préservation des tissus sains environnants la tumeur et sur le contrôle de la croissance des tumeurs irradiées. Aussi, le recours à des méthodes alternatives n'est pas envisageable dans ce projet et il nous est indispensable de développer des modèles animaux.

Réduire : Pour la réalisation de ce projet, 591 rats seront inclus dans des groupes de traitement comportant différentes doses et différentes configurations d'irradiation. Le nombre d'animaux a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible. Notre projet va nécessiter de travailler sur des rats chez lesquels la taille plus importante du cerveau va être plus adaptée aux types d'irradiations proposées dans le cadre des procédures expérimentales.

Raffiner : Les conditions d'hébergement des animaux sont optimisées pour limiter leur stress, avec par exemple, l'ajout d'éléments de Raffiner comme des rondins de bois ou de coton dans les cages. Les effets toxiques ne sont pas encore connus puisqu'il s'agit d'expériences pionnières. Les animaux seront néanmoins observés quotidiennement pour déceler d'éventuels signes de détresse ou de mal-être et des mesures adéquates seront prises pour arrêter immédiatement leur souffrance, à partir de points limites et de critères d'arrêt précis.

12640 Le glioblastome (GBM) est la tumeur du système nerveux la plus fréquente et la plus agressive, avec 200 000 décès par an dans le monde, une survie médiane de 14 à 16 mois et aucun traitement curatif. Les traitements actuels qui consistent en une résection de la tumeur chez 50% à 70% des patients ou en une biopsie des tumeurs non opérables, suivie du "protocole Stupp" (radiothérapie et chimiothérapie adjuvante au témozolomide (Temodal® de Merck) - pendant six mois). Malgré ces traitements, la rechute est systématique, due au caractère très agressif et infiltrant du GBM, ainsi qu'aux sous-types de GBM, y compris des cellules souches de GBM résistantes aux traitements actuels. En outre, les thérapies ciblées ou immunothérapies échouent, en raison de leur incapacité à traiter les différents sous-types de GBM ou d'effets secondaires importants. Il existe donc un besoin médical urgent et non satisfait en ce qui concerne un traitement innovant du GBM, à la fois efficace et sans danger.

Des travaux publiés ont montré l'entrée préférentielle et l'action antimitotique sélective du peptide NFL-TBS.40-63 dans plusieurs modèles cellulaires de GBM (rats, souris, humains). In vitro, ce peptide inhibe la prolifération, la migration et la viabilité des cellules de GBM, et in vivo, après une seule injection intra-tumorale (locale), il réduit significativement le volume tumoral chez des rats porteurs de GBM, entraînant une survie accrue des animaux, sans toxicité pour les tissus et organes sains.

Le but des prochains travaux est d'explorer un tel traitement, par voie périphérique ou centrale, chez des rats porteurs de GBM. En effet, une première étude sur le même modèle a déjà permis de montrer que la barrière hémato-encéphalique est lésée suite au développement du GBM, et permet donc le passage de molécules comme ce peptide. L'intérêt est d'évaluer l'efficacité thérapeutique du peptide et la posologie la mieux adaptée dans un modèle physiopathologique le plus proche possible de celui observé chez l'Homme, dans le but de développer un traitement contre le GBM et prévenir les rechutes chez les patients opérables ou non.

Les travaux de ce projet s'organisent en quatre études indépendantes qui consisteront à implanter à J1 des cellules de GBM de la lignée murine F98 par stéréotaxie dans le cerveau de rats Fischer adultes de 8-10 semaines, puis de les traiter à J21 avec une administration intraveineuse (i.v.) simple (étude I) ou répétée (étude II), ou avec une administration intra-carotidienne (i.c.) simple (étude III) ou répétée (étude IV) de peptide à doses croissantes, de témozolomide ou du véhicule (utilisé pour préparer le peptide). Ces études seront réalisées sur des rats femelles, puis en fonction des résultats, celles-ci seront répétées chez les mâles. Chaque étude comportera 6 lots de 8 animaux en fonction du traitement :

1) lot contrôle (véhicule), 2) lot de référence (témozolomide), 3) lot traité avec le peptide (dose 1), 4) lot traité avec le peptide (dose 2), 5) lot traité avec le peptide (dose 3), 6) lot traité avec le peptide (dose 4). Tout au long de l'expérimentation, les animaux seront suivis quotidiennement (comportement, alimentation, pelage) et pesés tous les jours. Ils ne seront mis à mort que lorsque le critère d'arrêt sera atteint. Celui-ci sera déterminé à partir d'un système de score prenant en compte plusieurs paramètres d'évaluation de la douleur et de la souffrance des animaux. L'efficacité anti-tumorale du peptide sera définie en fonction de la survie globale des animaux (jusqu'à 61 jours après la greffe tumorale). Des prélèvements d'organes et de sang post-mortem seront effectués afin de réaliser des analyses anatomopathologiques (pour détecter d'éventuelles traces de peptide).

Les différentes doses de peptide à tester seront définies en fonction de la solubilité du peptide et des résultats d'une étude en cours qui déterminera l'innocuité du peptide chez des animaux adultes sains, ainsi que sa dose maximale unique (MTD) et répétée (MTRD) sans effet néfaste.

Tous ces travaux respectent la règle des 3R, selon la directive européenne n°2010/63/UE

Remplacer : les caractéristiques de ce peptide ont déjà été testées sur des lignées de GBM (souris, rats, humains), mais pour évaluer son intérêt thérapeutique suite à une administration i.v. ou i.c., il est indispensable de passer sur un modèle animal avec un GBM dans le cerveau avant de pouvoir tester le peptide sur des patients atteints de ce cancer. A notre connaissance, c'est le modèle animal le mieux contrôlé, et il n'est pas possible de le remplacer par des modèles cellulaires.

Réduire : Pour l'ensemble des études, le nombre total de lots d'animaux est de 48, soit un nombre total de 528 animaux (10 animaux/lot = 480 + 10% en cas de perte liée au protocole chirurgical).

Ce nombre a été estimé en fonction des protocoles in vivo précédemment utilisés et pour obtenir des résultats statistiquement exploitables, en tenant compte des risques inhérents au protocole (anesthésie, stéréotaxie). Les études seront réalisées sur les rats femelles (car cela a été déjà effectué dans plusieurs études précédentes) puis selon les résultats (efficacité thérapeutique du peptide), nous pourrions moduler les doses à injecter chez les rats mâles et ainsi réduire au strict minimum le nombre d'animaux.

Raffiner : Une grille d'évaluation de la douleur est prise en compte au cas où un animal montrerait une douleur spéciale qui impose l'arrêt de l'expérimentation. Au fur et à mesure des études précédentes, nous avons pu affiner cette grille, et la prise en compte de la douleur animale. Enfin, un suivi quotidien du bien-être des animaux est réalisé, et plusieurs personnes sont impliquées dans ce suivi comme indiqué dans ce dossier

12641 L'état de stress post-traumatique (ESPT) ou PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder est une pathologie psychiatrique qui touche 8 à 12% de la population générale. Le PTSD se caractérise par une constellation de symptômes qui surviennent après l'expérience d'un événement traumatique pouvant être léthal, causer une blessure grave ou menacer l'intégrité physique. Ce traumatisme va provoquer une réaction de peur intense, un sentiment d'impuissance ou d'horreur. La symptomatologie du PTSD se définit alors par un syndrome de reviviscence traumatique, un évitement et émoussement affectif et une activation neurovégétative.

L'efficacité des thérapies pharmacologiques (antidépresseurs) ou psycho-cognitive reste cependant relative et limitée. L'amélioration de l'arsenal thérapeutique dans le traitement du PTSD représente donc un enjeu de santé publique majeur. Ces dernières années, une technique a émergé dans le traitement des troubles neuropsychiatriques : la stimulation magnétique trans-crânienne répétée (rTMS). C'est une technique qui offre l'avantage d'être non-invasive. Cependant, son emploi chez l'animal reste difficile compte tenu de la taille inadaptée des sondes humaines. Peu d'études ont donc été réalisées sur le petit animal et les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les effets thérapeutiques que l'on retrouve chez les patients PTSD traités par cette technique restent majoritairement inconnus. Dans ce projet, une sonde magnétique adaptée aux rongeurs sera employée.

L'objectif de cette étude sera de comprendre quels mécanismes moléculaires sous-tendent l'apparition des effets thérapeutiques de la rTMS en se focalisant sur trois structures particulièrement impliquées dans cette pathologie (cortex préfrontal, amygdale et hippocampe). En effet, on observe chez les patients des altérations, y compris fonctionnelles, du système limbique (qui comprend hippocampe et amygdale) avec une sur-activation de l'amygdale et une sous-activation du cortex préfrontal. Or ces altérations semblent réversées par la rTMS appliquée au niveau du cortex préfrontal.

Ce projet vise ainsi à mieux cerner les bases physiopathologiques du PTSD pour développer une alternative thérapeutique aux patients pharmaco-résistants. Pour cette expérience, 124 souris réparties en 8 lots expérimentaux de 15 souris mâles et 4 souris servant à la validation des paramètres de stimulation rTMS sont requises.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans cette étude :

Remplacer : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le PTSD chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduire : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité interindividuelle (n=15 sujets par groupe). Les souris seront uniquement mâles, afin d'éviter les variations comportementales provoquées par le cycle menstruel de la femelle et ainsi réduire le nombre total d'animaux.

Raffiner : le stress traumatique appliqué aux animaux peut être qualifié de modéré, en raison de sa brièveté. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur. Tous les animaux seront hébergés ensemble, stressés et non stressés, avec enrichissement du milieu, surveillés quotidiennement. Les expérimentateurs sont experts dans la préhension/contention des souris et sont soucieux d'éviter tout stress lors de la réalisation des procédures. Les injections quotidiennes d'antidépresseur ont été remplacées par un traitement dans l'eau de boisson. Pendant la stimulation rTMS, les animaux sont sous anesthésie gazeuse, ils sont placés sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie et leurs cornées sont protégées de la déshydratation par un gel. Néanmoins, des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt si les animaux montrent des signes de souffrance.

12642 Le traumatisme crânien (TC) est la cause la plus fréquente d'invalidité permanente chez les patients de moins de 40 ans. Aux lésions cérébrales primaires, engendrées par l'impact, se surajoutent, pendant les heures et les jours qui suivent, des lésions secondaires liées directement à la constitution des lésions primaires elles-mêmes, ainsi qu'à leurs conséquences physiopathologiques. Néanmoins certains travaux ont montré que les patients traumatisés crâniens étaient à risque de développer un syndrome post-commotionnel précocement après le TC. Ce dernier est l'association de troubles somatiques (céphalées, vertiges, tremblements, déficit sensitivo-moteur) et psychiatriques (irritabilité, agitation, agressivité, troubles mnésiques, comportements à risque) pouvant avoir un retentissement socio-professionnel important. De plus, le traumatisme de l'enfant comporte certaines spécificités dues à l'immaturité du cerveau et pourrait notamment être responsable de troubles du développement psychomoteur.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer le retentissement clinique d'un traumatisme crânien modéré de l'enfant. Pour cela nous utiliserons un modèle de traumatisme crânien modéré par lâcher de poids d'une faible hauteur sur des souriceaux mâles de 7 jours (Septième jour de la vie postnatale : P7). Dans ce modèle, il sera étudié les déficits comportementaux à la phase aigüe du traumatisme ainsi qu'au stade adulte.

Nous travaillerons sur deux groupes d'animaux :

- les animaux traumatisés
- les animaux non traumatisés (Sham)

Une série d'analyses comportementale sera effectuée afin de déterminer les défauts de l'interaction sociale éventuellement induits par le traumatisme crânien :

-Vocalises UltraSoniques (USV) à P8 : Les souris communiquent par des cris, situés dans la gamme des ultrasons et donc inaudibles par l'oreille humaine. Cette analyse permettra d'observer un éventuel défaut de communication.

- Analyses de la fonction respiratoire par pléthysmographie à P8. La pléthysmographie est une technique qui permet de mesurer les volumes et les fréquences respiratoires.

-Test de l'interaction sociale à P45.

Puis à la fin des tests comportementaux, les animaux seront euthanasiés selon les méthodes réglementaires et les cerveaux seront prélevés afin d'effectuer les analyses des tissus pour étudier les lésions de la substance blanche.

Cette étude prendra en compte la règle des 3R :

Remplacer : L'étude de l'impact du traumatisme crânien sur les réseaux neuronaux à distance du TC ne peut être envisagée qu'« in vivo ». Au vu de notre expertise et des données de la littérature le modèle que nous utiliserons sera la souris non transgénique.

Réduire : La bonne reproductibilité et le faible taux de mortalité (3%) de ce modèle expérimental permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques. Toutes les souris effectueront l'ensemble des tests comportementaux, afin de limiter le nombre d'animaux pour obtenir des mesures des performances. Le nombre d'animaux estimé et les tests statistiques utilisés sont basés sur notre expérience pour ce type d'étude. Ce nombre

minimum nous permettra d'être certains de répondre aux questions scientifiques de ce projet. L'analyse statistique de nos données nécessite $n=20$ animaux par groupe pour mettre en évidence une différence significative. C'est le nombre minimal de souris nécessaire pour l'obtention d'une puissance statistique suffisante avec les modèles expérimentaux de comportement. Néanmoins nous prévoyons de dupliquer l'étude, c'est la raison pour laquelle nous prévoyons 80 animaux dans ce projet d'une durée de trois ans.

Raffiner : La procédure de traumatisme (durée inférieure à 2 minutes) sera réalisée sous anesthésie générale gazeuse par Isoflurane. Une analgésie sera réalisée en la présence de signes de douleur (en fonction d'un score établi). Les animaux seront remis dans leur nid et on vérifiera que le retour au sein du nid se fait bien. Des grilles de scoring seront proposées en fonction de l'âge des animaux déterminants ainsi les points limites prédictifs : à la phase aiguë, on surveillera la fréquence respiratoire, la recoloration des extrémités, et le tonus. A distance du TC, on réalisera une surveillance régulière de la prise de poids, de l'absence de troubles du comportement (isolement, agressivité). Des critères d'arrêt seront identifiés. Les animaux seront hébergés en groupe en milieu enrichi pour minimiser leur stress.

12643 En chirurgie orthopédique et traumatologique, nous traitons quotidiennement la cicatrisation des tissus de collagène. La récupération fonctionnelle après ce type de blessure dépend de la cicatrisation du tissu de collagène. Le développement des matériaux de fils pour suture ou d'ancrages pour des réinsertions transosseuses a permis d'obtenir de bons résultats cliniques. En revanche, la limite semble atteinte de cette approche uniquement mécanique.

Depuis plus récemment, une approche biologique ouvre des perspectives d'améliorer la vitesse et la qualité de la cicatrisation du collagène. L'utilisation du probiotique que nous souhaitons utiliser pour l'étude a déjà démontré une capacité à améliorer la cicatrisation d'autres types tissulaires comme l'os ou la peau.

Nous proposons dans cette étude un modèle de lésion du collagène dans une population de souris soumises à un régime alimentaire pourvu de ce probiotique.

Le patient sportif crée un besoin énergétique important dû à son activité physique. L'anabolisme musculaire est important lors de l'activité physique. Ce métabolisme nécessite un apport supplémentaire en protéines par rapport à un régime normal. S'il ne modifie pas son régime alimentaire, le sportif sera rapidement carencé, particulièrement en protéine. L'utilisation d'une souris carencée en protéine permet d'imiter ce mécanisme.

D'autre part, nous utiliserons la rupture du tendon d'Achille comme modèle d'une lésion du collagène. Ce tendon est l'un des plus importants par sa taille et sa fonction. Il est accessible à un geste chirurgical. Sa réparation est identifiable selon des techniques histologiques couramment utilisées.

Nous cherchons donc à savoir si ce probiotique permet d'envisager une amélioration de la cicatrisation du collagène lésé. La perspective serait de proposer ce probiotique pour améliorer la cicatrisation tendineuse.

Notre étude respectera la règle des 3R :

Remplacer : Ce projet de recherche fondamentale avec une application directe à une pathologie humaine ne peut être réalisé chez l'homme. Il n'existe pas de méthodes alternatives ou de substitution pour répondre à notre question scientifique. L'utilisation d'un modèle animal reste pour l'heure indispensable.

Réduire : Nous utiliserons 80 souris dont 40 recevront le probiotique concerné. Nous pourrions ainsi comparer l'effet de la prise du probiotique sur la réparation tendineuse. Les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement pensés et élaborés afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.

Raffiner : Toutes les procédures chirurgicales se feront sous anesthésie générale associée à un traitement antalgique, ainsi les souffrances attendues lors des procédures réalisées dans ce projet pourront être soulagées efficacement. Néanmoins nous avons définis des points limites

d'interruption de l'expérience si nous étions amenés à constater une souffrance ou une angoisse infligée aux animaux, une surveillance journalière sera réalisée en respectant des points limites bien définis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

12644 En neurosciences, comprendre comment les nouvelles expériences quotidiennes sont stockées dans la mémoire est une question fondamentale. Dans le cerveau, une région importante pour la formation de la mémoire est l'hippocampe. Il est intéressant de remarquer que des cellules cérébrales ont des composants importants du système endocannabinoïde (SEC) qui peuvent moduler la mémoire en contrôlant leur activité. En effet, le système endocannabinoïde, composé de récepteurs et de molécules circulantes qui les activent, est un système majeur à haute expression et impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques importantes. Des recherches antérieures ont montré que le THC (Tetrahydrocannabinol, présent dans le cannabis) peut affecter les fonctions de la mémoire en dérégulant le SEC. Cependant, bien que nous disposons d'informations sur le SEC en terme d'intoxication au cannabis, nous ne comprenons toujours pas comment le SEC est impliqué dans la modulation de la fonction de la mémoire en l'absence d'intoxication au cannabis. Ainsi, ce projet vise à étudier finement la contribution du SEC dans différentes cellules du cerveau dans le processus de la mémoire. Parce que la dérégulation du SEC est souvent impliquée dans de nombreuses pathologies, ce projet apportera des informations importantes qui pourront être utilisées dans le développement de stratégies thérapeutiques pour traiter ces troubles de la mémoire. Cette étude sera réalisée chez la souris parce que les mécanismes de formation de la mémoire dans le cerveau de la souris sont conservés chez les mammifères de la même façon et qu'ils sont plus simples que dans le cerveau humain. La durée de ce projet est de 5 ans et utilisera 2100 animaux. D'un point de vue méthodologique, nous avons développé ce projet pour respecter le principe important des 3R :

Remplacer : Pour comprendre les mécanismes complexes de la mémoire, qui dépendent du comportement actif du rongeur, on ne peut pas utiliser des méthodes alternatives plus simples (cultures cellulaires *in vitro*, modèles informatiques *in silico*) car celles-ci fournissent des informations trop limitées et ne peuvent reproduire toute la complexité d'un organisme vivant.

Réduire : Nous nous engageons à utiliser le nombre minimum d'animaux strictement nécessaire pour avoir des conclusions solides en recourant aux méthodes statistiques communes (12-14 animaux par groupe). Il est important de noter que ce nombre comprend des pertes regrettables (taux d'échec de 15%) au cours des procédures de neurochirurgies

Raffiner : En effectuant un petit nombre d'expériences pilotes au début de ce projet, nous pouvons réduire considérablement le nombre d'expériences ultérieures (et donc le nombre d'animaux) nécessaires pour tirer des conclusions au niveau des populations. De plus, les procédures comprendront un protocole spécifique pour gérer toute douleur qui peut réapparaître au cours des procédures. Il s'agit notamment d'une analgésie appropriée avant, analgésie/anesthésie pendant et analgésie après les interventions qui provoquent la douleur (p. ex. neurochirurgie). Il est important de noter que pour diminuer les pertes après les interventions, nos animaux sont surveillés quotidiennement selon des critères prédéfinis afin de s'assurer que tout le bien-être requis est assuré. Cependant, s'ils ne se rétablissent pas convenablement et s'ils atteignent les points limites ultimes de la procédure, ils seront sacrifiés sans douleur pour mettre fin immédiatement à leur souffrance. Dans ce projet, les animaux auront toujours accès à l'enrichissement de l'environnement (p. ex. matériel de nidification) dans un environnement contrôlé.

12645 Les pays développés connaissent depuis plusieurs années un prolongement de l'espérance de vie et un vieillissement de leur population, entraînant une augmentation de la prévalence des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson. Cette maladie est l'une des maladies neurodégénératives les plus fréquentes, après la maladie d'Alzheimer. Elle se manifeste par une hétérogénéité de symptômes tels que les tremblements au repos, l'instabilité posturale et des altérations cognitives et du langage qui affectent la qualité de vie des patients. L'apparition progressive de ces dysfonctionnements neuropsychologiques est due à la perte progressive de neurones situés dans une zone du cerveau appelée substance noire. Ces neurones sécrètent la

dopamine et projettent dans une autre zone, le striatum. Les causes de cette perte neuronale sont encore mal connues.

Cependant de nombreuses études montrent la participation de cellules gliales activées dans la mise en place de processus inflammatoires et dégénératifs observés dans la maladie de Parkinson.

Le but de ce projet est de mieux comprendre comment l'activation de ces cellules gliales entraîne une modulation de l'activité des neurones affectés dans la maladie de Parkinson et de déterminer si les astrocytes (type de cellules gliales le plus abondant du système nerveux central, jouant un rôle important dans l'homéostasie du cerveau) pourraient être des cibles pharmacologiques pour le traitement de cette maladie. Afin de répondre à cette question, nous utiliserons l'expérimentation in vivo seule apte à reproduire le plus fidèlement possible les interactions glie-neurones dans l'environnement physiologique.

Pour cela nous mettrons majoritairement en œuvre une approche virale de transfert de gènes dans les astrocytes de la substance noire et du striatum. Des études comportementales, de biologie moléculaire et d'immunohistochimie seront menées sur un total de 658 souris, sur une période de 5 ans. A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre le rôle des astrocytes dans la maladie de Parkinson et les mécanismes impliqués.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer Il n'existe pas, dans notre domaine, d'alternative satisfaisantes aux méthodes expérimentales proposées dans notre projet. Les cultures in vitro des astrocytes ne reproduisent pas les mécanismes physiopathologiques existant in vivo.

Réduire : les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.

Raffiner : De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale et des points-limites ont été établis, avec la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

12646 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un industriel pharmaceutique qui développe des composés thérapeutiques dans le domaine des troubles métaboliques. Au cours d'études cliniques menées précédemment par le client sur des patients diabétiques, le composé X a présenté des effets bénéfiques inattendus sur la fonction cardiovasculaire. Par ailleurs, lors d'une seconde étude clinique, le même composé a induit, chez le patient diabétique, des situations rares mais critiques d'acidocétose. Étonnamment, des données précédemment obtenues indiquent que ces deux effets pourraient être liés par un mécanisme d'action unique. En effet, les effets protecteurs au niveau cardiaque du composé X pourraient provenir d'une utilisation accrue des corps cétoniques en tant que source énergétique par ce tissu, du fait d'une disponibilité augmentée de ces composés. L'hypothèse concernant le composé X chez le rat diabétique (non traité à l'insuline) sera testée dans le cadre d'un autre projet ayant obtenu un avis favorable du comité éthique. Le présent projet vise à étudier l'impact du composé X sur l'évolution des corps cétoniques dans un contexte de rats diabétique de type 1 traités à l'insuline, de manière à mimer au mieux le contexte dans lequel les études cliniques ont été menées (patients diabétiques traités à l'insuline). Le modèle animal de diabète qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de divers composés pharmaceutiques ou agroalimentaires sur le diabète. Il s'agit d'un modèle de rats rendus diabétique de type 1 via une administration unique de STZ. Cette administration induit une destruction partielle des cellules pancréatiques responsables de la sécrétion d'insuline. Ce modèle est ainsi un excellent modèle au regard de la pathologie humaine

Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de mieux caractériser les effets physiologiques et de mieux comprendre les mécanismes d'action de leurs composés.

Le projet consistera en 4 phases :

- Une phase de 7 jours d'acclimatation à l'animalerie après réception suivie de 7 jours permettant d'habituer les animaux à l'administration par voie orale. Cette phase d'habituation consistera également à la mise en place d'un modèle de rat diabétique de type 1 par administration de Streptozotocine (STZ).

- Une première phase expérimentale conduite 8 jours post-administration de STZ qui se limitera à une administration unique du composé X par voie orale chez des rats préalablement mis à jeun pendant 14h et à des prélèvements sanguins réalisés en bout de queue (10µl / prélèvement) à 0, 1h, 2h, 3h, 4h et 5h post-administration. Les animaux recevront une administration d'insuline juste avant le traitement au composé X.

- Une période de 11 jours.

- Une seconde phase expérimentale conduite 20 jours post-administration de STZ qui se limitera à une administration unique du composé X par voie orale chez des rats préalablement mis à jeun pendant 14h et à des prélèvements sanguins réalisés en bout de queue (10µl / prélèvement) à 0, 1h, 2h, 3h, 4h et 5h post-administration. Les animaux recevront une administration d'insuline juste avant le traitement au composé X.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du projet :

Remplacer : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur les variations de taux de corps cétoniques

Réduire : Pour cette étude un total de 104 rats seront nécessaires, divisés en 8 groupes expérimentaux. Le nombre d'animaux utilisés par groupe a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

Raffiner : Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Notamment, les prélèvements sanguins en série nécessaires aux dosages de corps cétoniques seront limités à un volume de 10 microlitres, soit un volume total de 60 microlitres par animal et par jour de mesure. Ceci est rendu possible par l'utilisation de bandelettes réactives de dosage des corps cétoniques plasmatiques. Un enrichissement du milieu de vie sera assuré par l'ajout de petites briquettes en bois et de tube en carton. Enfin, bien que le protocole soit relativement peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites et des critères d'arrêt établis.

12647 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (ou MICI) se caractérisent par une inflammation de la paroi de l'intestin et sont la conséquence d'une réponse immunitaire intestinale inadaptée à l'encontre des bactéries habituelles de la flore intestinale. Ces maladies conduisent à d'importantes contraintes telles que la diarrhée pouvant contenir du sang et des glaires, les douleurs abdominales, la perte de poids, la fatigue ... Du fait des symptômes, ces maladies altèrent considérablement la qualité de vie des patients, surtout pour les formes graves.

Face aux formes sévères de MICI, différents traitements permettent aujourd'hui aux patients de traiter les poussées symptomatiques et dans une moindre mesure de les espacer : corticoïdes, immunosuppresseurs, biothérapies, chirurgie... Ces traitements sont efficaces mais restent lourds pour le patient avec de nombreux effets secondaires (ostéoporose, effet neuropsychiatrique...). De nouvelles stratégies thérapeutiques à base de polymère naturel anti-inflammatoire et antibactérienne pourraient être prometteuses. La pulpe de baobab, polymère naturel, possède des propriétés anti-inflammatoires démontrées in vivo dans un contexte d'inflammation articulaire. L'objectif principal du projet est de mettre en évidence si une supplémentation en pulpe de baobab pourrait apporter un bénéfice aux patients atteints de MICI. Pour tester ces hypothèses, des souris recevront différentes pulpes de baobab administrées par gavage, avant et après induction de l'inflammation intestinale (7 jours). Différentes analyses seront réalisées sur les animaux des différents groupes (témoin vs traitement), poids, analyse des fèces. Après l'euthanasie, un maximum de prélèvements et de mesures seront réalisés de façon à optimiser au mieux l'utilisation de ces animaux : sang, poids du foie, coecum, poids de la rate, mesure et poids du colon.

Dans le cadre de la règle des 3R,

Remplacer : L'utilisation des animaux est nécessaire pour répondre à la problématique du projet sur l'inflammation intestinale, nécessitant le fonctionnement d'un organisme entier.

Réduire : le nombre d'animaux utilisés a été réduit au minimum (37 animaux au total) dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet et afin d'assurer des résultats statistiquement significatifs.

Raffiner : Les animaux seront élevés dans des cages de 900 cm² (6 à 8 animaux par cages) avec libre accès à l'eau et la nourriture. Si des signes de douleur sont observés, l'animal concerné sera isolé et du paracétamol (200 mg/kg) lui sera administré par gavage 2 fois par jours. Les animaux seront observés quotidiennement pour repérer des signes de stress ou de douleur. Ces animaux seront sortis du schéma expérimental. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt. Si une perte de poids importante est observée, les animaux seront euthanasiés, lorsqu'ils atteindront 85% de leur poids initial. Enfin, les animaux seront euthanasiés s'ils présentent une attitude inhabituelle traduisant un mal-être ou bien du sang dans les fèces pendant plus d'une semaine. Les conditions d'hébergement sont les suivantes : température 20-24°C, hygrométrie 60 plus ou moins 10%, cycle 12h/12h, éclairage 360/460 lux. Des pesées journalières sont prévues.

12648 L'ocytocine, plus communément appelée « l'hormone de l'amour » est un petit peptide qui régule les comportements sociaux chez les mammifères. Bien qu'elle soit bien connue pour son rôle dans la lactation et l'accouchement, l'ocytocine est également sécrétée dans le cerveau pour moduler les interactions sociales (parent-enfant, fraternel, avec un congénère inconnu, ...). Le système ocytocine est en réalité beaucoup plus complexe et encore mal connu. En effet, l'ocytocine, et la vasopressine, un peptide apparenté, se lient sur les récepteurs à l'ocytocine et à la vasopressine, et l'ensemble de ces acteurs contrôle les interactions sociales. L'administration d'ocytocine comme de la vasopressine restaure l'interaction sociale chez les mammifères souffrant de déficits d'interaction sociale, dont l'Homme (autisme, schizophrénie, addiction). De plus, il semblerait que les déficits d'interaction sociale soient liés à des dysfonctions dans le système ocytocine-vasopressine.

L'objectif de cette étude est de 1) déterminer les dérégulations (communes) du système ocytocine-vasopressine dans des modèles de souris souffrant de déficits d'interaction sociale (fraternel et avec un congénère inconnu) et 2) d'identifier quels récepteurs de ce système restaure l'interaction sociale.

Les déficits d'interactions sociales sont connus pour affecter sérieusement le bien-être des animaux et donc de leur santé. Ces expériences menées dans le modèle souris, un petit mammifère social, vont significativement contribuer à l'augmentation des connaissances scientifiques pour démêler la complexité du système ocytocine-vasopressine, mais également à la découverte et au développement de traitements innovants chez les animaux d'élevage et les humains souffrant de déficits d'interaction sociale. La souris est le modèle idéal de par sa taille réduite, la grande conservation des acteurs du système ocytocine-vasopressine et la possibilité de moduler facilement leur comportement social.

Le nombre total maximum d'animaux dans ce but sera de 3424 souris. Le projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : Le comportement n'est mesurable que chez l'animal, il n'y a aucune alternative in vitro. Chaque composé utilisé sera préalablement validé in vitro.

Réduire : Notre étude vise à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés et le temps d'expérimentation. Les expériences en aigu (jour 1) et en chronique (jour 8) sont réalisées sur les mêmes groupes expérimentaux. Tous les cerveaux des animaux sont conservés et utilisés pour des études post mortem. Des conditions de réussite sont appliquées à l'utilisation de certains groupes. En effet, le nombre d'animaux sera réduit de moitié si aucun effet genre n'est mis en évidence.

Raffiner : Tous les animaux impliqués dans cette étude seront élevés en groupe. Les expériences de comportement sont réalisées dans le calme et sous des éclairages réduits afin de minimiser l'anxiété des animaux. Les animaux isolés après leur sevrage, auront plus d'enrichissement à leur disposition et seront élevés en contacts visuels, olfactifs et sonores avec les autres animaux. Enfin, les expériences seront menées dans les délais les plus courts possibles. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt pour éviter toute souffrance tout au long de la vie des animaux.

12649 Le cancer est une des principales causes de mortalité. Notre objectif est de développer un traitement du cancer plus efficace et avec beaucoup moins d'effets secondaires que les chimiothérapies classiques. Le carbone est un des constituants essentiels de la matière vivante. L'échelle nanométrique (un millionième de millimètre) confère au carbone des propriétés particulières parfaitement adaptées pour à la fois détecter (diagnostic) et tuer les cellules cancéreuses (thérapie, thérapie + diagnostic = théranostic). En choisissant la taille, la forme, la composition (nanodiamants, graphène, nanotubes) on obtient des nanoparticules aux propriétés particulières qui réagissent différemment aux cellules saines et cancéreuses. Plus de deux années de travaux sur la caractérisation physicochimique des nanoparticules de carbone et sur leurs comportements en présence de cellules saines et cancéreuses, nous amènent à tester in vivo, les potentiels thérapeutiques de deux types de nanoparticules de carbone : les nanodiamants et les graphènes oxydes. En effet, ces nanoparticules montrent une capture préférentielle par les cellules cancéreuses en comparaison des cellules saines. La spécificité du traitement sera acquise par l'application d'une stimulation infra-rouge qui en activant les nanoparticules provoqueront la mort des cellules cancéreuses. Notre projet consiste à implanter une tumeur chez des souris et à tester le potentiel anti-cancéreux de ces nanoparticules.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Après une phase d'étude de l'effet des nanoparticules « in vitro », il est nécessaire de tester leurs effets anti cancéreux sur un modèle « in vivo » complexe. L'utilisation d'animaux est indispensable à cette phase du projet

Réduire : Des études in vitro poussées ont permis de diminuer le nombre de nanoparticules à tester. Des analyses statistiques adaptées à notre étude permettent d'optimiser et de réduire le nombre d'animaux. Ce projet utilisera 46 souris.

Raffiner : L'amélioration des conditions d'hébergement et l'évitement de la douleur diminuent la variabilité des réponses individuelles et autorisent une diminution du nombre des animaux utilisés. Les animaux seront hébergés en cages collectives afin de préserver leurs interactions sociales. L'environnement sera enrichi par ajout dans les cages d'igloo en cellulose et de ouate de cellulose afin que les animaux puissent se constituer un nid. Le développement de la tumeur est indolore mais la taille de la tumeur sera évaluée quotidiennement afin d'évaluer le bien-être animal et la gêne occasionnée grâce à un système de scoring. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt. Le protocole ne prévoyant qu'un nombre limité d'injections sous cutanées mais aucune chirurgie ni aucune autre procédure invasive, la prise d'analgésique n'est pas jugée nécessaire.

12650 Les entérocoques, notamment *Enterococcus faecium*, sont des bactéries qui appartiennent à la flore intestinale normale de l'homme et qui sont responsables de nombreuses infections et épidémies hospitalières. L'émergence de certaines souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques rend difficile la prise en charge des infections dues à ces bactéries. De plus, *E. faecium* est capable de faire face à de nombreux stress environnementaux grâce à une importante capacité d'adaptation. Tous les mécanismes d'adaptation ne sont pas connus, mais différents types de régulateurs semblent intervenir. Parmi eux, les petits ARN (sARN) semblent jouer un rôle majeur. Récemment l'existence de différents sARN exprimés chez *E. faecium* a été démontrée pour la

première fois au laboratoire, mais il n'existe actuellement aucune donnée sur le rôle précis de ces sARN.

L'objectif du projet est de mieux comprendre le rôle des sARN dans l'adaptation de la bactérie lui permettant de passer de bactérie appartenant à la flore digestive normale au statut de bactérie responsable d'infection sévère à l'aide d'un modèle expérimental.

Des bactéries modifiées génétiquement dans lesquels chaque sARN sera enlevé seront préalablement créés (souche délétée). Un modèle de colonisation intestinale sera ensuite réalisé chez la souris. La colonisation digestive par les bactéries étudiées sera obtenue grâce à l'administration d'une solution de bactéries à la souris par une sonde de gavage. Cette solution contiendra soit la souche délétée seule soit la souche délétée et la souche non modifiée. A différents intervalles, deux boulettes de matières fécales seront recueillies pour chaque souris. A J10, l'intestin grêle et une partie du gros intestin seront prélevés et mis en culture sur différents milieux permettant de quantifier chaque souche. La capacité de colonisation de la souche délétée sera ainsi déterminée, seule et en compétition avec la souche non modifiée, ce qui permettra de préciser l'implication des sARN dans le mécanisme de colonisation. Enfin, les souches pour lesquelles un résultat important aura été mis en évidence, seront étudiées à l'aide d'une technique d'imagerie pour déterminer leur localisation et leur progression dans l'intestin.

En ce qui concerne la règle des 3R :

Remplacer : Il n'existe actuellement aucune méthode alternative à l'expérimentation animale permettant d'étudier l'effet in vivo des sARN.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en gardant un effectif correct pour une étude statistique fiable. Le nombre de souches a été réduit au maximum. Sur les 61 sARN mis en évidence, dix ont été sélectionnés en raison de leur implication dans la virulence démontrée chez d'autres bactéries, parce qu'ils sont exprimés lors d'un stress antibiotique, ou chez des souches responsables d'épidémies hospitalières. Au total, 1115 souris seront utilisées au maximum.

Raffiner : Les animaux seront élevés dans des conditions favorables à leur bien-être, dans des cages de taille appropriée, par groupe de cinq. L'environnement sera enrichi avec du coton, l'alimentation sera contrôlée et les soins quotidiens seront apportés par du personnel qualifié. Pour chaque procédure, les animaux seront surveillés quotidiennement avec évaluation de leur aspect physique et de leur comportement. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12651 L'utilisation des œufs ou ovocytes des crapauds griffus du Cap (*Xenopus laevis*) constitue une approche alternative à l'expérimentation in vivo pour l'étude des canaux ioniques et des récepteurs membranaires. L'ovocyte de xénope constitue un système d'expression hétérologue incontournable pour les études électrophysiologiques et pharmacologiques des récepteurs et des canaux ioniques. Les ovocytes sont de grandes cellules (1,2 mm) permettant des injections cytoplasmiques ou nucléaires de matériel génétique ou de préparations membranaires. Après quelques heures ou jours, les récepteurs ou canaux ioniques s'insèrent dans la membrane des ovocytes et leurs fonctions peuvent être mesurées par différentes techniques (électrophysiologie, techniques utilisant des sondes fluorescentes). Ce modèle biologique reste incontournable dans le domaine d'étude des propriétés pharmacologiques des récepteurs et des canaux ioniques (étude du mode d'action de toxine ou de médicament), pour l'identification des domaines de liaison d'agents pharmacologiques (anxiolytiques, toxines), étudier l'impact de mutations identifiées chez l'homme sur les propriétés des récepteurs et des canaux ioniques. C'est également le seul modèle existant à ce jour permettant à partir de biopsie d'organes d'origine animale ou humaine d'étudier l'activité des canaux ioniques et de caractériser les conséquences fonctionnelles d'une pathologie neuronale (épilepsie). De plus, certains canaux ioniques ou récepteurs membranaires ne s'expriment pas dans d'autres systèmes d'expression hétérologues.

Les ovocytes sont prélevés chez des xénopes femelles hébergées dans des aquariums adaptés à leur comportement naturel. Lorsque la production d'ovocyte devient insuffisante, les animaux seront euthanasiés. L'utilisation d'ovocytes de xénope permettra i) de comprendre les effets de molécules

neurotoxiques au niveau cellulaire et moléculaire, ii) de proposer des stratégies de recherche pour identifier des molécules à effet thérapeutique iii) d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques non encore caractérisées iv) de comprendre l'impact de mutation génétique identifiée dans des pathologies humaines sur le fonctionnement de canaux ioniques.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : L'utilisation de femelles xénopes est le seul moyen d'obtenir des ovocytes qui sont des modèles biologiques apportant de nombreuses données évitant d'avoir recours à une approche in vivo sur des vertébrés ou des mammifères.

Réduire : Une femelle xénope est opérée chaque semaine, permettant d'obtenir jusqu'à 400 ovocytes. Elle est ensuite en repos pendant au minimum 2 mois. 30 femelles sont donc nécessaires pour les besoins de nos recherches pour une durée de 5 ans. Cette approche est sans danger et sans douleur pour l'animal qui est utilisé uniquement comme donneur d'ovocytes. Ce nombre a été déterminé statistiquement permettant de réduire le nombre d'animaux à son minimum, mais aussi de réaliser des analyses statistiques non paramétriques (Tests ANOVA, Tests de Mann et Withney et de Kruskal-Wallis) exploitables.

Raffiner : Les prélèvements d'ovocytes sont faits sous anesthésie et les incisions effectuées sont suturées dans des conditions d'aseptise. Les femelles sont surveillés jusqu'à leur réveil et leur récupération. Elles sont aussi surveillées quotidiennement par le personnel de l'animalerie et leur poids suivi 2 fois par mois L'environnement des aquariums est enrichi par des objets (pots de fleur, images de plantes aquatiques). La structure du bien-être de l'animalerie est consultée régulièrement pour améliorer les pratiques d'élevage et d'expérimentation.

12652 Le but de ce projet est d'identifier de nouvelles molécules présentant des effets bénéfiques sur le comportement anxiodépressif. Parmi les maladies mentales identifiées, les affections le plus souvent retrouvées sont les troubles dépressifs et anxieux, regroupés sous le terme antidépressif, et pour lesquels les traitements existants sont parfois inefficaces. Plusieurs tests complémentaires seront utilisés, impliquant des stimuli différents. Certains tests sont basés sur les réactions innées de l'animal qui consistent à éviter une situation ou un environnement provoquant une anxiété (environnement inconnu, espaces ouverts, lumière forte, etc...). D'autres vont nécessiter un apprentissage qui va faire associer un élément (boisson ou nourriture) à un stimulus négatif. Ces tests entraînent un comportement d'évitement ou de résignation de type anxiodépressif. L'espèce que nous choisirons pour chaque test (rat ou souris) est celle pour laquelle le test a été le mieux caractérisé. Pour chaque nouvelle molécule étudiée, 3 à 5 tests comportementaux seront utilisés afin de mettre en évidence de potentielles propriétés anxiolytiques et/ou antidépressives. En effet, chaque procédure est complémentaire des autres, et fait intervenir des conditions différentes. Néanmoins, si une molécule montre des effets positifs significatifs dans 3 procédures testées, ces résultats sont suffisants pour conclure sur ses propriétés anxiolytiques/antidépressives. Si la molécule ne montre aucun effet dans 5 tests, son développement sera abandonné.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Les modèles cellulaires in vitro ne permettant pas de modéliser le comportement de type anxiodépressif, des modèles animaux doivent être utilisés pour la réalisation de ce projet.

Réduire : Les modèles animaux choisis (rats, souris) ont été largement étudiés et caractérisés dans la littérature, ce qui va permettre d'éviter une étape de mise au point et de limiter le nombre d'animaux nécessaires (groupes de 12 animaux pour obtenir des résultats statistiquement significatifs). Ce projet implique un maximum de 3 molécules x 5 tests x 4 lots (3 doses du composé et un groupe véhicule) x 2 (mâles et femelles) x 12 animaux par groupe = 1440 animaux (rats ou souris) par an (avec 3 molécules testées) soit 7200 animaux au maximum (3600 souris et 3600 rats) pour le projet, sur une période de 5 ans.

Raffiner Les animaux seront hébergés en groupe, dans un environnement enrichi (tunnel pour les rats, nids de papier pour les souris), et surveillés quotidiennement. L'état de santé et de bien-être des animaux sera suivi à l'aide d'une grille de points limites et des critères d'arrêt définis au préalable.

12653 La fusion entre les gènes EML4 (Echinoderm Microtubule-associated protein-like 4) et ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) est une altération génétique fréquente dans les adénocarcinomes pulmonaires, cette fusion confère aux cellules un fort potentiel oncogénique. Il existe des thérapies ciblées qui ciblent ALK et qui sont efficaces chez la plupart des patients présentant une fusion EML4-ALK, cependant l'efficacité du traitement reste limitée en raison de l'apparition quasi-systématique de mécanismes de résistance primaire ou secondaire. La voie de signalisation Notch est fortement activée dans les adénocarcinomes pulmonaires présentant une fusion EML4-ALK, et de façon intéressante, l'inhibition de Notch diminue l'activité d'ALK, ouvrant ainsi la possibilité de combiner des thérapies ciblées anti-ALK et des inhibiteurs de Notch.

L'objectif du projet sera donc maintenant de tester l'efficacité de combinaison des thérapies anti-ALK avec l'inhibition de Notch dans un modèle souris EML4-ALK "in vivo", nécessaire dans le cadre d'un potentiel développement clinique de cette association thérapeutique.

Pour cette étude, nous utiliserons un modèle de souris CD1 qui développe des tumeurs pulmonaires dépendant de la fusion EML4-ALK que nous séparerons en plusieurs groupes pour étudier la réponse aux traitements seuls ou en combinaison. Afin d'étudier leurs efficacités in vivo, nous utiliserons différents inhibiteurs de la voie NOTCH en combinaison avec l'inhibiteur de EML4-ALK. Les résultats obtenus permettront de définir l'efficacité de combinaison de thérapie ciblée anti- EML4-ALK avec l'inhibition de Notch afin de prévenir l'émergence de résistances à ce type de thérapie.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : La présence du système immunitaire et le microenvironnement tumoral, présent dans un organisme entier est nécessaire pour étudier les effets escomptés par le projet, nécessitant une validation « in vivo avec un modèle animal reproduisant au mieux la pathologie humaine.

Réduire : Un total de 300 souris sera nécessaire à la réalisation de ce projet. Ce nombre permet d'assurer la puissance statistique de l'étude et la fiabilité des résultats.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans des conditions qui répondent à la fois à la réglementation nationale et aux directives européennes dans le domaine de l'expérimentation et l'éthique animale. Le bien-être des animaux sera pris en compte. Les animaux seront manipulés avec précaution durant toute la durée de l'expérience, pour réduire leur stress. Les animaux seront surveillés afin de repérer précocement les signes de souffrance. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt. Les données seront évaluées de manière rétrospective.

12654 L'obésité est reconnue comme une maladie chronique par l'OMS depuis 1997, définie comme "une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». Les études épidémiologiques indiquent qu'en 2015, environ 2,3 milliards d'adultes étaient en surpoids, dont plus de 700 millions d'obèses. Cette prévalence inquiétante s'accompagne en outre d'une mortalité importante : on attribut directement à l'obésité environ 3,5 millions de décès par an au niveau mondial. Face ce contexte, l'armada thérapeutique s'avère relativement pauvre, et s'accompagne en outre de posologies contraignantes et d'effets secondaires non négligeables. Récemment, le rôle majeur du microbiote intestinal dans la mise en place et la maintenance de l'obésité et de ses troubles associés a été clairement mis en évidence. Ces données ont ouvert un champ de recherche important visant à d'identifier des souches bactériennes bénéfiques dans ce contexte pathologique afin de développer des traitements de type probiotiques.

L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'une série de 3 formulations en développement, de type probiotiques, destinées à l'amélioration de l'obésité, du diabète de type II et de leurs symptômes associés. Notre objectif est d'évaluer l'impact de ces formulations sur la prise alimentaire, le poids corporel, la composition corporelle, les dépenses énergétiques, l'activité locomotrice, la régulation glycémique et la régulation lipidique chez des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique (60% de l'énergie issue des graisses) pendant

10 semaines préalablement au début du traitement. Ces derniers seront administrés par voie orale pendant 40 jours alors que les animaux seront maintenus sous le même régime enrichi en graisses. La présente étude nécessitera l'emploi de 56 souris C57Bl/6 réparties en 5 groupes expérimentaux composés de 8 animaux (groupe contrôle du modèle sous une alimentation standard) à 12 animaux (2 groupes contrôle du traitement et 3 groupes traités avec les formulations X, Y et Z).

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du projet :

Remplacer : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et les troubles métaboliques.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de notre expérience acquise sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

Raffiner : Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et les troubles métaboliques. Nous utilisons ce modèle en routine au laboratoire. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Pour des raisons techniques (mesures de prise alimentaire), les animaux seront hébergés en cages individuelles mais un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score et de critères d'arrêt permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

12655 Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche destiné à identifier de nouvelles molécules permettant de traiter la cirrhose hépatique. Cette pathologie est définie par l'accumulation excessive de fibrose conduisant à la dégénérescence du foie. Suivant le stade, elle est difficilement réversible. L'incidence annuelle de la cirrhose du foie en France est estimée à 150 à 200 cas par million d'habitants avec un nombre de décès d'environ 15000 par an. C'est une des complications majeures des maladies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine alcoolique, virale, métabolique ou liée à l'exposition à certains médicaments. La cirrhose constitue un véritable état précancéreux car elle s'accompagne d'une augmentation de la régénération des cellules hépatiques et donc du risque d'altérations génétiques. Parmi eux, le carcinome hépatocellulaire (CHC) est de loin le plus fréquent et il se développe dans plus de 90 % des cas sur une cirrhose, qu'elle qu'en soit l'origine. A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la cirrhose. Aussi, plusieurs voies de recherche et de développement sont en cours pour palier à ce déficit. Afin d'étudier et d'étayer nos hypothèses lors du développement de nos molécules, il nous sera inévitable d'avoir recours à des modèles animaux présentant une pathologie similaire à celle qui se produit chez l'Homme, des méthodes alternatives n'étant pas disponibles à ce jour. Il existe plusieurs méthodes pour induire expérimentalement une cirrhose hépatique chez l'animal de laboratoire. Nous utiliserons le modèle de cirrhose hépatique induit par l'administration chronique de thioacétamide (TAA) chez le rat. A terme, nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de certaines formes de maladies hépatiques chroniques, aujourd'hui ce besoin médical est clairement établi

Le Thioacétamide est un composé organosulfuré utilisé en tant que fongicide, il est classé cancérigène de classe 2B. Ce modèle permet le développement d'une cirrhose, pouvant évoluer vers un hépatocarcinome. Les procédures expérimentales utilisées dans ce projet sont de classe sévère et seront réalisées dans les conditions les moins stressantes possibles pour les animaux.

Remplacer Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer le plus possible l'utilisation des animaux

Réduire : Les molécules ayant prouvé un potentiel thérapeutique dans ces études feront alors l'objet d'une évaluation chez l'animal. Ce projet engagera des rats et dans un nombre estimé à 3050

individus pour la durée que couvrira ce projet. Le nombre d'animaux utilisés dans chaque lot de chaque procédure est réduit, il correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'apprécier, avec nos moyens techniques et en fonction de la variabilité inter individus, les effets désirés.

Raffiner : Il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal, en respect des lignes directrices des bonnes pratiques de l'administration de substances et de prélèvement de sang. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état. Des soins lui seront apportés et il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée s'il atteint les points limites ultimes définis. Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être. Notre connaissance du modèle ou de modèles hépatotoxiques proches, nous permet de définir des points limites éthiquement et scientifiquement acceptables, en tenant compte des objectifs de l'étude.

12656 Le maintien de la balance énergétique dépend de l'équilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. Il existe des systèmes de régulation de la prise alimentaire qui permettent un équilibre entre les apports énergétiques, les dépenses et le maintien du poids corporel autour d'une constante. Une dérégulation du système peut conduire à l'obésité et aux maladies métaboliques qui lui sont associées. De très nombreuses études ont montré l'association positive entre obésité et diabète de type 2 (DT2).

Le DT2 est la forme la plus fréquente de diabète (90 % des cas). Il se caractérise par une augmentation du taux de sucre dans le sang (hyperglycémie), car le corps utilise mal le glucose (sucre) comme source d'énergie. Cette hyperglycémie chronique entraîne de nombreuses complications tels que des maladies cardiovasculaires, des accidents vasculaires cérébraux, la cécité, l'insuffisance rénale et des lésions nerveuses.

De nombreux gènes ont été associés à l'apparition du DT2. Cependant, leur fonction dans la survenue du DT2 est inconnue. Notre équipe de recherche s'intéresse à l'un de ces gènes identifiés dont la fonction est ignorée. Nous avons généré des souris génétiquement modifiées, dont le gène d'intérêt a été invalidé. Les données de notre laboratoire montrent que les animaux ont un poids et un apport alimentaire diminués par rapport aux animaux témoins après 5 mois de régime riche en gras. Ces diminutions sont associées à une amélioration de la glycémie des souris. Nous émettons l'hypothèse que ce gène pourrait être impliquée dans le maintien de la balance énergétique et la dérégulation de son expression pourrait contribuer ainsi au développement du DT2.

Dans le cadre de ce projet, nous utiliserons le même modèle de souris génétiquement modifiées que précédemment, dans lequel le gène d'intérêt est invalidé. Par contre, l'invalidation du gène sera effectuée dans tous les tissus de l'animal pour préciser les résultats obtenus précédemment mais aussi spécifiquement dans le cerveau (centre de régulation de l'appétit et de la satiété).

Les souris seront soumises à un régime alimentaire standard ou à un régime enrichi en gras afin d'induire une obésité. Pour induire l'obésité chez la souris nous générerons aussi des souris modifiées génétiquement pour devenir obèses dès 8 semaines dont le gène d'intérêt sera aussi invalidé dans tous les tissus. Ces 2 modèles nous permettront d'induire une obésité et une résistance à l'insuline caractéristiques du stade pré-diabétique chez le patient.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : La régulation de la glycémie nécessite la participation de plusieurs organes interdépendants (foie, îlots de Langerhans, muscles, tissus adipeux, cerveau). Ces mécanismes complexes ne sont présents que dans des organismes complexes tels que la souris.

Réduire : Nous utiliserons un total de 312 animaux. Le nombre d'animaux testés dans chaque expérience nous permettra une comparaison statistique adaptée entre les différents groupes tout en tenant compte des impératifs de réduction. Par ailleurs, plusieurs procédures expérimentales (avec un temps de récupération adaptée pour les animaux) seront réalisées chez les mêmes cohortes de souris.

Raffiner : Les animaux sont hébergés dans des cages avec un enrichissement essentiel pour leur bien-être (Coton + Carton). La litière des animaux est remplacée une fois par semaine. Les animaux sont surveillés par le personnel qualifié tous les jours. Le stress lié aux procédures nécessitant l'isolation des animaux sera diminué par l'usage de cages transparentes rendant leurs congénères visibles. Aucune douleur ou souffrance n'est attendu dans la plupart des procédures expérimentales utilisées mais l'usage d'anesthésique et d'analgésique sera systématique pour les procédures expérimentales potentiellement douloureuses. L'habituation des souris à l'opérateur aura systématiquement lieu quelques jours avant l'expérience et les différentes expériences seront réalisées par du personnel qualifié afin d'éviter le stress lié à la manipulation des animaux. Les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum nécessaire pour les analyses biochimiques et les volumes injectés seront adaptés au poids de chaque animal selon les recommandations. Chaque semaine, la prise de poids, la quantité de nourriture sont mesurées permettant ainsi un suivi hebdomadaire des souris. La taille du matériel utilisé sera adaptée à la taille des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement pour réduire tout inconfort ou douleur qui se développerait et des points limites seront déterminés pour éviter toute souffrance animale. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé, après avis vétérinaire.

12657 Le Syndrome de Chudley McCullough (CMCS) est une maladie rare (1/1.000.000) qui se caractérise par une surdité sévère, précoce et complexe associée à des anomalies cérébrales sévères. Le CMCS semble être la conséquence de mutations du gène GPSM2 (G Protein Signaling Modulator 2), sans que l'on connaisse les bases moléculaires de cette pathologie. Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés au CMCS, l'étude chez l'animal est indispensable.

Notre objectif pour ce projet est de comprendre l'origine des malformations cérébrales. Pour cela nous allons dans un premier temps étudier l'effet de la mutation de Gpsm2 sur la formation du cortex et dans un deuxième temps l'implication de 3 partenaires moléculaires potentiels.

Règle des 3R.

Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation, notamment tous les outils utilisés dans ce projet (plasmides) ont été validés préalablement sur cellules en culture.

Réduire : Pour n'utiliser que le nombre minimal d'animaux tout en garantissant la validité scientifique et statistique des résultats 132 souris par an sur 5 ans sont nécessaire pour chaque condition expérimentale. Nous testerons l'effet de 10 mutations de Gpsm2 trouvées chez l'homme et ses partenaires puis l'effet endogène des mutations sur dix modèles murins mimant les anomalies cérébrales sévères du CMCS. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 264 souris par an sur 5 ans soit 1320.

Raffiner : Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, un suivi post-opératoire et des points limites suffisamment précoces et des critères d'arrêt ont été mis en place. Les animaux sont hébergés dans des cages permettant de reproduire leurs comportements naturels avec des éléments d'enrichissement (carrés de cellulose) et ont un accès libre à la nourriture et à l'eau de boisson.

12658 Ce projet propose d'étudier l'utilisation d'odeurs de type sexuelles (phéromones), comme outil complémentaire aux approches existantes pour la lutte contre les pullulations de campagnols terrestres (*Arvicola terrestris*). Ces pullulations sont en effet responsables d'importants dégâts sur les prairies dans les régions d'élevage, notamment en Auvergne.

Du fait de leur vie nocturne ou souterraine qui rend peu efficace les indices visuels, l'olfaction joue un rôle majeur dans la communication sociale et sexuelle chez de nombreuses espèces de rongeurs (souris, rat, hamster, campagnols américains...). Les signaux olfactifs utilisés qui sont notamment contenus dans l'urine permettent de signaler le territoire, d'informer sur l'état physiologique ou

d'attirer un partenaire sexuel. Des composés olfactifs ont été préalablement identifiés chez le campagnol terrestre dans l'urine, mais aussi au niveau des glandes latérales qui pourraient aussi servir au marquage olfactif. Nous désirons tester le pouvoir attracteur sur le plan comportemental des composés olfactifs candidats identifiés, Il est à noter que l'utilisation de phéromones présente un certain nombre d'avantages indéniables. Tout d'abord les phéromones sont des composés espèce-spécifiques ; elles présentent ensuite un haut degré de spécificité dans le couplage stimulus-réponse (entre la molécule utilisée et la réponse des congénères), ce qui assure que d'autres espèces proches ont un risque faible de répondre à ces composés. Par ailleurs, ce couplage est généralement assuré à des concentrations très faibles de molécules (par ex. dans le cas de la phéromone mammaire chez la lapine de l'ordre de quelques ng/ml). Enfin, ces molécules sont des résidus du métabolisme et donc sans danger pour l'environnement (car de plus, efficaces à des doses très faibles).

Pour évaluer le pouvoir attracteur des composés olfactifs candidats, nous utiliseront 312 animaux lors des tests olfactifs.

Concernant les exigences de Remplacer, de Réduire et de Raffiner de la règle des 3R

Remplacer : L'étude du comportement ne peut pas se faire via des méthodes alternatives telles que la modélisation ou l'étude in vitro. L'utilisation d'animaux est donc nécessaire pour évaluer l'effet comportementale des composés olfactifs candidats.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au maximum en tenant compte de la variabilité des réponses comportementale afin de maintenir une puissance statistique satisfaisante

Raffiner : Les animaux seront hébergés en groupes sociaux et dans des cages placées dans la pénombre pour mimer l'habitat naturel de ces rongeurs et leur permettre une activité normale. Les Campagnols recevront une nourriture variée comprenant des végétaux frais cueillis dans la nature. Les cages comprennent des cachettes et du matériel leur permettant de faire leur nid. Ils sont manipulés avec précaution par un personnel formé à l'élevage d'animaux de la faune sauvage. Notre projet ne doit pas provoquer de dommages physiques sur les animaux. Cependant, si des animaux tombent malades ou sont blessés accidentellement, ils seront pris en charge, tant que les soins, eux-mêmes, ne génèrent pas un stress trop important chez ces rongeurs qui peut être facilement effrayés par les manipulations. Si le traitement n'est pas possible, nous procéderons à l'euthanasie si la souffrance se maintient.

12659 Dans le cadre de la réalisation de prestations de techniques de cryoconservation et de reproduction assistée sur rongeurs au sein de notre laboratoire spécialisé dans l'étude de la reproduction et pour les besoins de la communauté scientifique, nous avons recours dès que possible à un traitement de superovulation des femelles à collecter afin d'accroître leur rendement ovulaire et donc de réduire le nombre d'individus à utiliser. Nous privilégions ce traitement afin de réduire le nombre d'animaux à collecter.

Deux hormones sont utilisées pour l'établissement de cette superovulation : 1/ la PMSG est utilisée pour mimer l'effet de maturation des ovocytes des follicules endogènes (FSH) 2/ la hCG qui est utilisée pour mimer l'ovulation induite par la LH. Grâce à leur administration, il est possible d'induire chez les femelles traitées, une ovulation avec un nombre d'ovocytes supérieur à la normale et à un moment prévisible. La technique de superovulation décrite ci-dessous est celle couramment utilisée pour assurer les prestations de cryoconservation de modèles ou dans l'application de techniques de Raffiner d'élevage intégrant des transferts d'embryons visant à assainir une colonie respirante ou l'accroître plus rapidement.

La réponse à l'injection de gonadotrophine varie d'une souche à l'autre au sien même d'une même espèce de rongeurs. La dose optimale et l'âge des femelles sont préalablement définis pour chaque souche en effectuant des injections préliminaires dose-réponse et par expérience. En règle générale, des doses de 5 à 10 unités internationales (UI) par souris de chaque gonadotrophine et âgées de 21 à 35 jours (poids corporel de 12 à 14 grammes) donneront le meilleur rendement en œufs fécondés. Chez le rat, les doses varient entre 20 et 30 UI par individu femelle et de préférence prépubère.

Les femelles reçoivent une injection intra-péritonéale (IP) de sérum de jument gestante (PMSG) le jour 1.

Le 3ème jour (48 à 52 Heures après l'injection de PMSG), elles reçoivent une injection IP de gonadotrophine chorionique humaine (HCG).

Si la fertilisation à lieu IN VIVO, immédiatement après l'injection de hCG, la femelle est accouplée avec un mâle fertile pour une nuit. Le lendemain un contrôle de la présence ou de l'absence de bouchon vaginal, témoignant d'un coït est réalisé.

Si la fertilisation à lieu IN VITRO, les femelles sont prélevées après avoir été mise à mort par inhalation de CO₂ ou par dislocation cervicale selon les procédés autorisés par la directive 2010/63/UE et les ovocytes mis en contact de sperme fécondant dans un milieu et des conditions atmosphériques optimales pour la fécondation.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Sachant que la nature même du projet vise à obtenir un meilleur rendement ovulaire de l'espèce choisie pour réduire et raffiner, le remplacement des individus de ce dernier n'est pas envisageable.

Réduire : Nous réalisons la prestation à la demande de nos clients. Le nombre d'animaux dépend du besoin de ces derniers. Notre expérience dans le domaine nous permet de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaire. Nous réalisons ce traitement sur un nombre annuel maximum de 15 200 rongeurs.

Raffiner : Les animaux seront maintenus dans des cages contenant de l'enrichissement, dans des conditions optimales de température avec cycle jour/nuit de 12h/12h et avec accès à volonté à l'eau et à la nourriture. Ils seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié afin de s'assurer de leur bon état général : comportement, aspect du pelage, perte de poids, mobilité ou tous autres troubles seront vérifiés afin de s'assurer du bien-être des animaux. En cas de changement de comportement ou d'aspect, une surveillance augmentée sera mise en place. Des points limites précoces sont définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12660 La toxoplasmose est une zoonose (maladie transmise par les animaux) parasitaire cosmopolite due au parasite *Toxoplasma gondii*. Généralement bénigne, elle peut être grave pour le fœtus en cas d'infection de la mère pendant la grossesse et chez les patients immunodéprimés. Le diagnostic de l'infection toxoplasmique est donc essentiellement réalisé chez les femmes enceintes dont on veut connaître l'état de l'immunité avant ou au cours de la grossesse et chez les nouveau-nés en cas de suspicion de toxoplasmose congénitale. En effet, en France, il existe un programme officiel de prévention et de dépistage de la toxoplasmose congénitale particulièrement efficace. Le diagnostic peut être aussi pratiqué chez des sujets présentant des signes cliniques évocateurs de la maladie pour les différencier d'autres affections, chez des sujets immunodéprimés (SIDA, transplantés d'organes solides, greffés de moelle osseuse ...), chez les patients en état de coma dépassé pour le don d'organes.

La sérologie qui est la base du diagnostic de la toxoplasmose, repose sur la recherche d'anticorps spécifiques dirigés contre le parasite dans le sérum. Les techniques de détection de ces anticorps sont nombreuses sur le marché cependant elles sont imparfaites. Le biologiste souvent confronté à des difficultés d'interprétation des résultats fait alors appel à une expertise complémentaire effectuée par un laboratoire spécialisé. Par exemple, chez la femme enceinte la datation précise de l'infection est capitale car elle détermine la conduite à tenir chez la maman et le bébé pendant la grossesse et après la naissance de l'enfant. Notre laboratoire intervient dans le cadre de cette expertise complémentaire demandée pour confirmer ou infirmer les diagnostics. Dans ce contexte, nous avons besoin de culture de parasites vivants faite chez la souris pour réaliser de manière sensible, fiable et spécifique la détection des anticorps grâce à la technique de référence (le test de lyse des toxoplasmes vivants

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Pour assurer la qualité de cette détection, ces cultures de parasites sont réalisées chez la souris ne sont réalisables que chez la souris et ne sont pas remplaçables par des cultures in vitro. C'est pourquoi nous avons recours à l'expérimentation animale. Il n'existe actuellement pas d'alternatives validées à ces méthodes in vivo, nous ne pouvons donc pas remplacer les expériences in vivo.

Réduire : Afin de restreindre le nombre d'animaux nous nous limiterons aux seules expériences considérées comme absolument indispensables à l'obtention de résultats fiables. L'établissement de ce protocole optimisé évitera toute répétition inutile réduisant ainsi le nombre d'animaux à 15 par semaine. Nous utiliserons pour la réalisation de notre test clinique 3900 animaux sur 5 ans.

Raffiner : Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte depuis leur naissance jusqu'à leur mort. A ce titre, les souris seront suivies quotidiennement par du personnel qualifié et la mise en place d'une grille de points limites adaptés permettra de mettre à mort les animaux avant l'installation d'une trop grande détresse. Cependant, si les étapes de la procédure et les temps de prélèvement sont respectés, les points limites seront rarement atteints. Par ailleurs, l'environnement des animaux sera enrichi.

12661 L'ayapana (*Ayapana triplinervis*) est une espèce végétale exotique utilisée et réputée pour ses vertus thérapeutiques (ex : antibactérienne, antifongique, antivirale, cicatrisante...). Cependant, les études scientifiques montrant ces effets sont insuffisantes. Des données récentes obtenues in vitro en laboratoire nous ont permis de déterminer qu'à une concentration non toxique, l'huile essentielle et le composé majoritaire présentaient un effet antiviral.

Afin de mieux comprendre l'impact de cette huile sur l'organisme et pour démontrer sa non toxicité à l'échelle physiologique à sa concentration antivirale effective (démontré comme non toxique in vitro), nous souhaitons utiliser un modèle animal reconnu dans les études de toxicité, à savoir le poisson zèbre. De par des mécanismes physiologiques fortement conservés au cours de l'évolution, le poisson zèbre présente l'avantage d'être un modèle simplifié et reconnu pour sa pertinence dans l'étude d'un certain nombre de mécanismes physiologiques transposables à l'Homme. C'est notamment un modèle animal reconnu pour des tests de toxicité car il présente un arsenal d'enzymes détoxifiantes comme l'Homme.

Pour ce faire, nous utiliserons des poissons qui seront traités et seront euthanasiés à 3 jours (n=2) ou 7 jours (n=2) après les traitements :

- en balnéation avec l'huile essentielle d'*Ayapana triplinervis* (3 x 4 animaux)
- en balnéation avec le composé majoritaire de l'huile : 2,5-diméthoxy-paracymène (3 x 4 animaux)
- en balnéation avec le véhicule (3 x 4 animaux)
- en injection avec l'huile essentielle (3 x 4 animaux)
- en injection avec le composé majoritaire de l'huile : 2,5-diméthoxy-paracymène (3 x 4 animaux)
- en injection avec le véhicule (3 x 4 animaux)

Afin d'obtenir la quantité de tissus nécessaires aux analyses, ces expérimentations pourront être répétées au maximum 3 fois (soit 36 animaux par conditions maximum).

Cette étude répond à la règle des 3R :

Remplacer : Des tests in vitro ont déjà été réalisés afin de déterminer la toxicité de cette huile et de son composé. L'étude menée ici se place à des concentrations montrées comme non toxique sur les cellules A549, concentrations qui présentent de surcroît un effet antiviral. Il semble indispensable de passer au modèle animal pour nous assurer de la non toxicité de ces composés. Le poisson un modèle pertinent utilisé par la communauté scientifique pour la compréhension de divers processus physiologiques et pathologiques.

Réduire : les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible, tout en permettant de réaliser des études statistiques (student t-test et ANOVA). Ainsi, chaque expérimentation est scindée en trois sous-expérimentations impliquant 4 animaux (3x4 animaux), ce qui permet d'arrêter l'expérimentation en cas de mal-être animal. De plus, si les résultats obtenus au cours des expérimentations permettent de réduire le nombre d'animaux, le nombre total de 216

animaux ne sera pas atteint. Il est toutefois nécessaire de prévoir une grande quantité d'animaux pour pouvoir s'assurer de quantité de matériel suffisant pour les études géniques/histologiques.

Raffiner : : les poissons seront placés dans des conditions optimales (cycle jour/nuit : 14h/10h, température : 28.5°C ; oxygénation). Les animaux seront nourris plusieurs fois par jour, et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale.

12662 Notre vie quotidienne est une chaîne complexe et discontinue de décisions et d'actions qui définissent nos comportements. Face à une situation de choix, chaque individu tendra à sélectionner la meilleure action possible parmi l'ensemble des alternatives possibles. Ce processus de « prise de décision » intervient sur la base d'une évaluation subjective propre à chaque individu des coûts et bénéfices de chaque action. Le cortex préfrontal a émergé comme un acteur potentiel de ce processus. Les mécanismes synaptiques et neuronaux restent cependant peu connus à ce jour. Notre projet tirera partie des méthodes *in vivo* les plus modernes (optogénétique) afin de bloquer de façon spécifique et réversible le cortex préfrontal, et donc de déterminer les relations causales entre le traitement de l'information dans le cortex préfrontal et les comportements de prise de décision.

L'étude des mécanismes de la prise de décision est un enjeu sociétal et économique majeur des neurosciences modernes, comme le relèvent de nombreuses situations humaines inadaptées (prise de risque, addiction au jeu, compulsivité...).

Respect de la règle des 3R ;

Remplacer : Par définition, ces mécanismes ne peuvent être étudiés que chez des animaux vigiles confrontés à une situation de choix. Dès lors, aucun des modèles *in vitro* ne peut être utilisé ici.

Réduire : Au total, 300 souris seront utilisées dans notre projet. La solidité de nos hypothèses de travail (vérifiée par des expériences pilotes), la nature innovante des méthodes utilisées (optogénétique), ainsi que la qualité de la mise en œuvre des procédures (basée sur une expertise reconnue de l'expérimentateur) permettra de réduire significativement le nombre des animaux.

Raffiner : Les chirurgies se feront sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès le réveil de l'animal et qui sera maintenue tant que l'animal montre des signes de souffrance. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

12663 Aucune catégorie de sexe, ethnique, culturelle ou socioprofessionnelle n'est épargnée par l'Accident Vasculaire Cérébral (AVC). Cette pathologie, qui est provoquée par un manque d'apport en oxygène au niveau du cerveau (ischémie) tient en échec la recherche biomédicale depuis des décennies. Actuellement, les patients victimes d'un AVC se voient proposer un répertoire extrêmement limité d'options thérapeutiques qui se résume dans la majorité des cas à des approches visant à rétablir la circulation cérébrale (reperfusion). De plus, les patients ne sont pas toujours éligibles pour ce type de traitement et seul un nombre limité de ceux qui le reçoivent se rétablissent parfaitement. Ainsi l'incidence de l'AVC, des décès et invalidités sous-jacents (50% des survivants d'AVC présentent des déficits moteurs, cognitifs ou amnésiques résiduels suffisamment graves pour nécessiter une assistance au quotidien) continuent de croître. L'AVC est donc sans aucun doute l'une des maladies les plus dévastatrices au monde et représente un fardeau social et économique énorme. La découverte de nouvelles molécules pharmacologiques et de leurs cibles qui conduirait à la mise au point de nouveaux médicaments est donc un défi majeur de santé publique dans un domaine dépourvu de solutions thérapeutiques efficaces.

Le projet expérimental présenté ici découle de travaux antérieurs suggérant que les médicaments ciblant la voie des polyamines pourraient améliorer la tolérance hypoxique d'un organisme et par extension d'un organe. Nos travaux récents ont démontré que l'inhibition d'une protéine impliquée dans la synthèse protéique (appelée eIF5A) par la molécule GC7 protège de l'occlusion transitoire

de l'artère rénale et donc du manque d'oxygène dans les cellules rénales. eIF5A est une protéine conservée également dans les cellules neuronales. Par conséquent, l'objectif de ce projet est de tester in vivo, l'effet du GC7 et d'un de ses dérivés (Molécule X sous dépôt de brevet) sur la prévention et le traitement de l'ischémie cérébrale.

Plus précisément, nous déterminerons l'efficacité de ces molécules sur :

- 1/ la Réduire de la taille de l'infarctus suite à une ischémie cérébrale,
- 2/ la récupération des activités motrices et cognitives des individus post-AVC.

Pour cela des groupes de souris seront traitées avec un placebo ou du GC7 ou de la Mol X. Les injections seront réalisées avant et/ou après l'induction d'une ischémie cérébrale. A la suite de ces procédures, une étude comportementale des animaux (tests moteurs et cognitifs) sera réalisée et les dommages induits au cerveau seront analysés par immunohistochimie.

Ce projet utilise donc d'une part des procédures simples d'injection qui n'affecteront que faiblement la qualité de vie des animaux, et d'autre part une procédure de chirurgie induisant l'ischémie cérébrale et des procédures d'étude comportementale. L'ensemble de ces procédures est parfaitement maîtrisé par le personnel impliqué dans ces expérimentations. Ainsi, la démonstration que notre molécule d'intérêt réduit l'infarctus cérébral et améliore la récupération fonctionnelle ouvrira de nouvelles perspectives thérapeutiques. Nos résultats devraient susciter un intérêt croissant pour le développement et le test de nouveaux inhibiteurs de eIF5A et se traduire rapidement en soins aux patients.

Ce projet a été élaboré et sera réalisé dans le respect des 3R

Remplacer : L'efficacité des molécules d'intérêt (GC7 et Mol X) a été testée au préalable in vitro et les effets du GC7 dans l'amélioration de l'ischémie rénale ont d'ores et déjà été mis en évidence in vivo

Réduire : Le nombre minimum d'animaux nécessaires sera utilisé tout en conservant la pertinence des données statistiques soit 720 souris au maximum

Raffiner les animaux seront hébergés dans des locaux appropriés avec les enrichissements requis et des méthodes d'anesthésie et d'analgésie adaptées seront utilisées. Les souris seront suivies quotidiennement via une grille de score qui définit des points limites précoces et adaptés. L'atteinte d'un point limite entrainera l'arrêt immédiat de la procédure pour l'animal concerné. Les expériences avec la Mol X ne seront réalisées que si les résultats avec le GC7 le justifient. De plus, il est à noter qu'aucune toxicité du GC7 n'a été trouvée chez l'animal et aucune toxicité du ciblage de la voie polyamine n'a été mise en évidence chez l'homme.

12664 Dans la cadre de la directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, retranscrite en droit français par le décret no 2013-118 du 1er février 2013, complété par l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques, le personnel en lien avec les animaux est tenu de maintenir ses compétences en réalisant des formations spécifiques a raison de 3 jours par période de 6 ans. Pour acquérir, maintenir et réactualiser les compétences en matière de chirurgie, une formation est organisée.

La durée de cette formation sera de 1 jour et sera assurée par un spécialiste en chirurgie vétérinaire. Les objectifs pendant cette formation seront (i) le Raffiner des techniques d'administration et de prélèvements chez la souris (ii) la formation aux techniques de la collecte du liquide céphalo-rachidien (LCR) et du sang total par ponction intracardiaque chez la souris et (iii) la gestion et l'amélioration des conditions d'anesthésie d'analgésie, d'asepsie, au cours d'une chirurgie.

Cette formation permettra également de respecter la règle des 3R

Remplacer : Ce projet concerne est une formation pratique «in vivo » pour une meilleure maîtrise des techniques de prélèvement chez la souris . Son utilisation est donc nécessaire. Il n'existe pas de modèle de substitution pertinent pour l'apprentissage de la maîtrise de ces actes

Réduire : Les animaux, utilisés dans ce projet en nombre optimisé pour tendre vers un nombre minimal, sont donc valorisés au maximum dans le cadre de cette formation. Le nombre d'animaux

utilisé sera réduit au strict minimum pour la démonstration et la réalisation par les stagiaires soit au total 30 souris.

Raffiner : Les souris sont issues de l'activité d'élevage de la plateforme d'expérimentation animale, et sont hébergées dans des cages enrichies par des igloos et des Nestlets. Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long de leur vie. La procédure se fait sous anesthésie générale et avec des antalgiques adaptés pour éviter toute souffrance. Elle est sans réveil.

12665 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre de prestations contractuelles, qui développe des formules alimentaires lactées hydrolysées pour nourrisson pour lesquelles il souhaite obtenir des allégations santé relatives à la « Réduire du risque d'allergie aux protéines de lait ». Parmi les contraintes réglementaires associées à ces allégations santé, la Directive Européenne 2006/141/CE fixe, dans son ANNEXE 4, les conditions autorisant ce type d'allégation santé, et notamment le fait d'être en mesure de démontrer que « les préparations pour nourrissons administrées par voie orale ne doivent pas provoquer de réactions de sensibilisation chez les animaux auxquels les protéines intactes qui sont à la base de la préparation pour nourrissons ont été administrées » (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32006L0141>). Ainsi, dans le cadre de demandes de cette allégation santé, et afin de tester la sécurité des formules hydrolysées à base de lait de vache avant les premières études chez l'humain, il est inévitable de mesurer, chez l'animal, leur allergénicité sur un modèle sensibilisé avec les protéines intactes natives, ainsi que leur capacité résiduelle d'induction d'anticorps spécifiques envers ces mêmes protéines.

Dans ce contexte réglementaire, le principal objectif de la présente étude est de développer et de valider un modèle à façon d'allergie alimentaire provoquée par des protéines de lait de vache chez la souris, afin d'être en mesure d'évaluer par la suite la propriété hypoallergénique de formules lactées en développement par la société cliente. Le modèle mis au point doit permettre de mesurer :

- 1) la capacité réduite de provocation d'un phénomène allergique par les formules à tester chez des souris préalablement sensibilisées à des protéines de lait intactes.

- 2) la sensibilisation résiduelle éventuelle que pourrait provoquer l'ingestion de ces mêmes formules.

La présente étude sera conduite sur la base de séries expérimentales répétées, visant l'obtention d'un modèle reproductible et de biomarqueurs fiables.

Les séries expérimentales seront basées sur un paradigme expérimental de 5 semaines durant lesquelles les animaux recevront un régime dépourvu de protéines de lait et comportant deux étapes majeures :

- La sensibilisation consiste en une administration orale hebdomadaire pendant 4 semaines d'une protéine de lait de référence ou d'une formule lactée.

- Le test de provocation est réalisé une semaine après la dernière sensibilisation et se décompose en deux étapes : une injection intradermique d'une formule lactée (sensibilisation réalisée par la protéine de référence) ou d'une protéine intacte de référence (sensibilisation réalisée par la formule lactée : test de la sensibilisation résiduelle), suivie, d'une période d'observation des animaux permettant une évaluation des symptômes allergiques (œdème cutané, température corporelle, réaction anaphylactique). Après 48h, une administration orale des mêmes composés sera réalisée suivie d'un prélèvement sanguin.

Dans le cadre du développement du modèle, il est prévu de tester 4 protéines intactes de références (à deux doses) ainsi que 4 formules lactées (à deux doses, et selon 3 formes : poudre, liquide et épaissie) et ceci pour les deux conditions expérimentales. Plusieurs types de groupes expérimentaux seront donc nécessaires à la conduite du projet :

2 types de groupes expérimentaux :

- Sensibilisé par l'une des 4 protéines intactes de lait de référence / Provoqué par l'une des 4 formules lactées

- Sensibilisé par l'une des 4 formules lactées / Provoqué par l'une des 4 protéines intactes de lait de référence

1 type de groupes « contrôle positif » :

- Sensibilisé par l'une des protéines intactes ou l'une des formules lactées/ Provoqué par la même protéine ou la même formule lactée

2 types de groupes « contrôle négatif » :

- Non Sensibilisé / Provoqué par l'une des protéines intactes ou l'une des formules lactées

- Sensibilisé par l'une des protéines intactes ou l'une des formules lactées/ Non provoqué

Compte tenu du grand nombre de combinaisons que le projet implique, l'ensemble du développement nécessitera un total maximum de 296 groupes de 8 animaux, soit 2368 souris sur 3 ans.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du projet :

Remplacer : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici du fait des contraintes réglementaires exposées au début du présent paragraphe et du fait qu'il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution efficace n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude du caractère hypoallergénique d'une formulation destinée à l'humain, tout particulièrement lorsque l'allergie en question est d'origine alimentaire

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

Raffiner : Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle bien caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur l'allergie alimentaire. Le protocole a été planifié de façon à limiter tout stress et inconfort pour les animaux. Pour des raisons techniques (mesures de prise alimentaire), les animaux seront hébergés en cages individuelles mais un enrichissement du milieu sera assuré par des igloos et du matériel de nidification. Le projet est basé sur des procédures expérimentales en elle-même peu invasive, mais les réactions allergiques induites peuvent conduire jusqu'au choc anaphylactique lors des phases de provocation réalisées en fin de procédure expérimentale, l'induction de ce dernier étant un des paramètres critiques à mesurer au cours de l'étude. Le choc anaphylactique constitue un point limite et tout animal présentant une telle réaction serait immédiatement euthanasié. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des autres points limites établis.

12666 Les programmes de vaccination dans l'industrie porcine ont apporté une contribution importante dans la santé des animaux et dans l'amélioration de la productivité. L'adjuvant joue un rôle important dans l'efficacité des vaccins porcins. Le choix du bon adjuvant a un impact majeur sur la stimulation du système immunitaire. En effet, une meilleure efficacité et une meilleure tolérance sont sans cesse recherchées. De nouveaux adjuvants, en particulier d'origine naturelle sont particulièrement recherchés.

Dans ce protocole, l'évaluation de l'immunité des adjuvants chez le porc repose sur l'utilisation d'un vaccin contenant un antigène bactérien inactivé, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP). L'innocuité sera appréciée par l'observation des réactions locales au site d'injection (échines) après chaque administration (J0 et J28) et par un suivi de la température corporelle. A l'abattage (J110), les échines sont récupérées pour observer directement les réactions tissulaires. L'efficacité du vaccin est appréciée par un suivi sérologique des anticorps spécifiques de l'antigène (à J0, J28, J70 et J110). L'objectif du projet est donc de tester de nouveaux adjuvants pendant trois ans, avec 5 groupes de 8 animaux par an soit 120 animaux.

Respect de la règle des 3R :

REMPLECEUR Du fait de la complexité du système immunitaire au sein duquel de nombreux organes et acteurs cellulaires et/ou humoraux sont impliqués, l'expérimentation in vivo reste incontournable.

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

RAFFINER : Les animaux seront hébergés dans des loges sur caillebotis équipés de chaînes et balles (jouets) avec accès à l'eau ad libitum et nourriture matin et soir. Ils ont accès à une zone de repos propre distincte de la zone d'alimentation. Afin de diminuer le stress des animaux lié à la contention, les porcelets seront manipulés régulièrement dès leur naissance (caresses, jeux). Les interventions seront réalisées dans le calme avec récompense alimentaire. Les animaux feront l'objet d'une surveillance biquotidienne et les points suivants feront l'objet d'une vigilance particulière :

-> surveillance de la température des animaux, surtout dans les 72h qui suivent les injections. Une augmentation de la température rectale de 0.5°C est fréquemment observée après l'administration des vaccins. En cas de fièvre (+2°C) par rapport à la température de référence, un antalgique/antipyrétique sera administré à l'animal.

-> réaction inflammatoire au niveau du site d'injection pendant toute l'étude avec des mesures de la réaction cutanée pendant trois semaines à la suite de chaque injection. Des réactions de 5 cm de diamètre au niveau du site d'injection sont fréquemment observées. Des réactions de plus de 10cm de diamètre feront l'objet d'un traitement anti-inflammatoire.

-> réaction allergique : en cas de réaction allergique de type anaphylactique (dyspnée, collapsus, cyanose, hyper salivation, convulsions, vomissements) observée au cours des minutes qui suivent la première administration du vaccin, l'animal subira une injection d'antihistaminiques en intraveineuse lente, il sera ensuite placé à l'écart de ses congénères et considéré hors expérimentation.

-> comportement anormaux : en cas de comportements anormaux entre des individus (comportement de dominance avec violence, caudophagie ou au contraire comportement de prostration, individus dominés par un autre chez qui le vaccin aurait été inefficace), les animaux seront séparés pour éviter toute atteinte à leur intégrité physique par un congénère.

12667 La malnutrition chronique chez l'enfant est un problème majeur de santé publique dans les pays en développement, touchant aujourd'hui plus de 150 millions d'enfants dans le monde. Les conséquences à long terme sont particulièrement délétères, notamment marquées par un retard de croissance ainsi que des déficits neurocognitifs qui persistent à l'âge adulte. De nombreuses études suggèrent que les macronutriments critiques dans cette période de la vie sont les protéines. Une alimentation appauvrie en protéines induit notamment un retard de croissance chez le rongeur. Des études récentes suggèrent un lien fort entre composition du microbiote intestinal et régime nutritionnel. En particulier, une intervention probiotique chez le rongeur dans un contexte de malnutrition permet de compenser partiellement le retard de croissance chez le juvénile.

L'objectif de cette étude est d'étudier conjointement l'effet d'un probiotique (un micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante, exerce des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels) sur la croissance juvénile, le microbiote intestinal et le développement du système nerveux entérique chez un modèle standardisé de souris gnotobiotiques (dont la composition du microbiote intestinal est simplifiée et contrôlée, contrairement aux souris conventionnelles dont le microbiote est complexe et difficile à qualifier et quantifier) nourri avec un régime appauvri en protéines induisant un retard de croissance comparable à celui observé chez les souris conventionnelles. Il s'agira notamment de comprendre l'impact de la malnutrition protéique sur le développement du système nerveux entérique. Nous faisons l'hypothèse qu'une intervention probiotique chez les individus juvéniles permettra de restaurer partiellement les déficits observés dans le contexte de malnutrition. Cette étude permettra donc l'établissement d'un modèle préclinique ouvrant la porte à de possibles visées thérapeutiques chez l'Homme.

Le projet a été conçu pour respecter la règle des 3R

Remplacer : Cette étude implique une réponse intégrée au niveau de l'organisme (interactions nutrition/microbiote), ce qui justifie une étude chez l'animal.

Réduire : Le nombre d'animaux et de groupes a été réduit au maximum sans toutefois mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Il s'agit d'une étude sur 120 souris portant sur 5 ans, en raison de la durée du protocole et du nombre de groupes considérés.

Raffiner : La mise en place de points limites bien définis et suffisamment précoces et prédictifs pour prévenir tout stress et toute douleur chez l'animal. Les conditions d'hébergement, les soins et les procédures seront réalisées par du personnel qualifié

12668 Notre laboratoire, qui est un centre national de référence, a développé une thématique importante de découverte de nouveaux agents pathogènes en particulier les bactéries intracellulaires dont la culture est difficile, voire impossible et souvent infructueuse puisque des milieux spécifiques n'ont pas pu être mis au point. Le laboratoire reçoit plusieurs milliers de prélèvements (sang, biopsies, LCR, arthropodes, insectes...) effectués par des vétérinaires ou des médecins dans le cadre de consultations ou de projets de recherches. Certains de ces prélèvements contiennent des micro-organismes en petite quantité qui n'ont jamais été décrits ou dont la culture n'a jamais été mise au point, d'où l'intérêt d'amplifier les pathogènes en les inoculant à un animal de laboratoire sensible. A partir des prélèvements de l'animal infecté il sera possible d'ensemencer une gamme variée de milieu afin d'identifier et de mettre au point une culture axénique. Des souris ou des cobayes seront utilisés en fonction de la nature du germe à isoler.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : A l'heure actuelle, l'animal reste la seule alternative pour isoler les pathogènes notamment s'ils sont en petite quantité ou pour lesquels on ne dispose pas encore de modèle de culture établie.

Réduire : Etant donné que l'animal n'est utilisé dans ce projet que pour isolement, nous n'avons pas besoin d'un nombre élevé d'animaux car il n'est pas besoin de tests statistiques pour démontrer une significative ce qui nous amène à ne pas dépasser 2 animaux par prélèvement. En outre, afin de maximiser les données obtenues de chaque animal, plusieurs tissus seront prélevés (sang, foie, rate, cerveau, poumons, tissu adipeux et moelle osseuse). Une cinquantaine de prélèvements seront concernés par ce projet chaque année (d'après notre expérience précédente sur les 5 dernières années), donc 500 animaux seront utilisés sur 5 ans (environ 90 souris par an et 10 cobayes par an).

Raffiner : Pour limiter toute souffrance et/ou angoisse des animaux, nous mettons en œuvre des mesures d'acclimatation en zone d'hébergement d'une semaine avant de commencer les manipulations. Les animaux seront hébergés en cages collectives et un enrichissement sera assuré par l'ajout des igloos et de matériel de nidification. Les animaux seront suivis quotidiennement même les jours fériés et pesés chaque 3 jours à la recherche de signes douloureux ou de comportement anormal par un personnel entraîné et compétent. En outre, une grille du suivi qui tient compte de l'apparence physique, du poids corporel, des signes cliniques et du comportement de l'animal, est établie, ce qui permettrait de mieux évaluer la douleur et la souffrance de l'animal ainsi des mesures qui vont d'une analgésie par la buprénorphine à l'arrêt de l'expérimentation seront prises en fonction du score obtenu sur une grille d'évaluation. Une perte de poids (>20%), un dos voûté, un pelage mal toiletté ou une détresse respiratoire sont des signes que le manipulateur recherchera et prendra en compte pour procéder à l'arrêt de l'expérimentation.

12669 Les habitudes alimentaires ont beaucoup évolué ces dernières décennies, d'abord dans les pays occidentaux, puis dans les pays en voie de développement, avec en parallèle une augmentation de la prévalence de l'obésité, du syndrome métabolique et du diabète. Dans ce contexte, il a été rapporté que la consommation de glucides à fort index glycémique (boissons sucrées, préparations alimentaires industrielles, tout type de sucre ajouté) est augmentée dans toutes les classes d'âge et participent activement au développement de ces pathologies. La principale cause de mortalité chez ces patients sont les maladies cardiovasculaires. De nombreuses études ont mis en évidence

le lien entre dysfonction vasculaire, sensible aux modifications du métabolisme énergétique à l'origine de processus inflammatoires et oxydatifs, et altération de la fonction cardiaque chez ces patients. Ainsi, pour limiter les effets délétères des sucres ajoutés sur la santé métabolique et cardiovasculaire notamment, des substituts de type édulcorants sans valeur nutritive (très peu ou zéro calories ; produits light ou sans sucres) ont été proposés. Parmi ces molécules approuvées (aspartame, saccharine, stevia par exemple) dans l'alimentation, le sucralose représente 62% du marché des édulcorants dans le monde. Ces édulcorants possèdent un pouvoir sucrant par gramme très supérieur à un produit sucrant calorique tels que le glucose, sucrose, sirop de maïs ou encore les concentrés de jus de fruits. Selon les dernières estimations, plus de 15% des produits alimentaires ou boissons consommées comportent des édulcorants contribuant ainsi à une augmentation progressive de la consommation chez l'adulte et l'enfant. Cependant, des études chez l'animal montrent qu'une consommation régulière de boissons ou aliments édulcorés est associée à une augmentation de la prise alimentaire et du poids. Chez l'Homme, leur consommation a été associée à un risque accru d'accouchement prématuré chez les femmes enceintes, un risque d'hypertension artérielle mais également à l'augmentation de l'indice de masse corporelle et de complications cardiométaboliques. Ainsi, il semble important de comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents induits par les édulcorants afin de prévenir chez les populations saines et à risques, des complications ou aggravation cardiovasculaires et métaboliques. Les altérations de la fonction vasculaire chez les sujets atteints d'une pathologie métabolique résultent d'un ensemble complexe d'interactions entre les différents tissus et impliquent des processus biologiques systémiques et locaux complexes (inflammatoires, stress oxydant par exemple). L'objectif de cette étude sera donc d'évaluer, chez des modèles de souris saines ou obèses et diabétiques, les effets d'une consommation d'édulcorant (sucralose) sur l'adiposité, le métabolisme et la fonction vasculaire, et de caractériser les mécanismes intervenant dans les processus observés. Ainsi, 75 souris seront nécessaires afin de pouvoir mener à bien toutes les analyses fonctionnelles vasculaires et métaboliques, histologiques et biochimiques. Au cours du protocole de 12 semaines (régime standard, régime obésogène associé ou non à une supplémentation en sucralose à des doses journalières basées sur la consommation humaine), des évaluations (microcirculation cutanée par Laser Doppler, mesure des pressions artérielles et tests de tolérance à l'insuline et au glucose) seront réalisées afin de pouvoir suivre l'évolution des paramètres d'intérêt tout au long du protocole.

Cette étude prendra en compte la règle des 3R :

Remplacer : A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle in vitro permettant d'étudier les effets d'une consommation d'édulcorants sur la fonction vasculaire. En effet, les altérations de la fonction vasculaire chez les sujets atteints d'une pathologie métabolique résultent d'un ensemble complexe d'interactions entre les différents tissus et impliquent des processus biologiques d'origine aussi bien systémiques que locales, évoluant suivant le développement de la pathologie. Les effets de la consommation des édulcorants sur la fonction vasculaire pourraient ainsi impliquer un effet systémique. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'homme.

Réduire : Malgré une diversité non négligeable de molécules édulcorantes, nous nous concentrons sur une d'entre elles afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Raffiner : Il a été prévu d'utiliser un enrichissement de l'environnement sous forme d'igloos, de tubes, de coton pour permettre la création de nids et de bâtonnets en bois à ronger. Lors des anesthésies nécessaires pour l'étude de la microcirculation cutanée, une anesthésie à l'isoflurane est privilégiée avec l'application d'un onguent ophtalmologique. Pour éviter toute souffrance, des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12670 Dans le but d'installer des colonies de souris dans une zone exempte de pathogènes spécifiques de la souris, et apporter ainsi une amélioration importante du bien-être de nos animaux, nous

souhaitons éliminer un maximum de potentiels agents pathogènes (bactéries et parasites) actuellement présents dans notre élevage et élever ainsi le statut sanitaire des animaux.

Plusieurs techniques efficaces existent, telle que le transfert d'embryons et leur réimplantation dans des femelles porteuses, cette technique nécessite cependant un nombre initial important d'animaux (10 à 15 adultes par lignée). Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires, nous proposons de mettre en œuvre une technique de césarienne aseptique, qui est une technique moins invasive et moins lourde que la réimplantation d'embryons.

Pour effectuer une césarienne aseptique, nous réalisons une césarienne en conditions stériles sur une souris de statut sanitaire "sale" à 18,5 jours de gestation. Une fois les nouveau-nés extraits de l'utérus et placés en zone stérile, ils seront méticuleusement assistés durant les premières minutes de leur vie, stimulés et réchauffés. Enfin ils seront rapidement mis à l'adoption auprès d'une souris "propre" adoptante, ayant mis bas la veille et dont le statut sanitaire est propre. Les petits grandiront ensuite normalement et entreront dans la partie élevage de l'animalerie ou dans des procédures expérimentales.

Nous serons attentifs au bon déroulement de la procédure et nous porterons une attention particulière au soin des nouveaux nés et nous nous attacherons à tout mettre en œuvre pour que leur adoption se passe le plus facilement possible grâce notamment à l'imprégnation d'odeur.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Nous souhaitons pratiquer des césariennes sur souris, nous ne pouvons pas nous passer de ce modèle animal pour permettre aux petits de grandir auprès de leur mère nourricière.

Réduire : Nous pensons sur 5 ans réaliser 20 césariennes de souris, ce qui correspond au maximum à 200 souris nées sous césarienne (en comptant en moyenne haute 10 petits nés par césarienne). Cette technique permet de réduire de manière importante les biais expérimentaux dus à la présence potentielle de parasites, d'infections ou autres pathologies.

Raffiner : L'objectif global du projet permettra de raffiner les conditions expérimentales des autres projets de l'Etablissement Utilisateur. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt pour éviter toute souffrance tout au long de la vie des animaux.

12671 Les lymphomes sont des tumeurs malignes qui se développent à partir des lymphocytes, cellules sanguines qui constituent un sous-groupe de globules blancs. Les lymphomes primitifs du système nerveux central ou lymphome oculo-cérébraux (LOC) sont des lymphomes qui se développent dans le cerveau sans atteinte des autres organes. Ils peuvent être associés à une atteinte de l'œil, des méninges (enveloppes entourant le cerveau et la moelle épinière) et du liquide céphalo-rachidien (liquide présent entre les méninges), et plus rarement de la moelle épinière. C'est une forme rare de lymphome. Les raisons du développement de cette maladie dans le cerveau sont peu ou mal connues. Le traitement de ces lymphomes doit tenir compte de leur localisation dans le système nerveux central. En effet, toutes les chimiothérapies habituellement utilisées dans les lymphomes ne sont pas efficaces pour traiter les localisations cérébrales et certains traitements peuvent être toxiques pour le cerveau. Les traitements habituels des LOC reposent sur une chimiothérapie comportant du méthotrexate à fortes doses, médicament actif sur les cellules lymphomateuses et qui pénètre dans le cerveau. Cette chimiothérapie peut être complétée par de la radiothérapie ou par une chimiothérapie intensive selon des caractéristiques individuelles. De nombreux progrès restent à faire, tant pour mieux connaître la façon dont se développe le lymphome dans le cerveau, que pour améliorer le taux de guérison des personnes touchées par cette maladie. Les médicaments en cours de développement tendent à cibler certains signaux anormaux du cycle cellulaire responsables de la prolifération des cellules malignes. Cependant, nous apprenons grâce aux études biologiques en cours, que les lymphomes cérébraux sont un ensemble de tumeurs hétérogènes à l'échelle moléculaire. Il est donc important de bien choisir ces traitements dits « ciblés » selon chaque type de tumeur. L'objectif de ce travail est de développer des modèles murins de ces lymphomes à partir de prélèvements issus des biopsies tumorales ayant servi pour établir le diagnostic de la maladie. Ces modèles murins nous permettront d'analyser le mode de développement selon le profil moléculaire des tumeurs, et de vérifier leurs sensibilités à différents

médicaments connus ou en cours de développement, utilisés seuls ou en association, avant de pouvoir les proposer aux patients. Il est ainsi important d'obtenir une « banque » de modèles représentant toute la diversité des tumeurs observées chez l'homme. En pratique, les reliquats des biopsies tumorales ou des prélèvements de liquide céphalo-rachidien ayant permis d'établir le diagnostic seront implantés dans les cerveaux de souris immunodéficientes. Différents types d'analyses de ces tumeurs seront effectuées pour les caractériser. En parallèle de la constitution de la banque, nous nous attacherons à développer des lignées cellulaires à partir de ces modèles pour pouvoir sélectionner in vitro les molécules les plus efficaces et limiter ainsi le nombre d'animaux utilisés par la suite. D'autre part, la caractérisation moléculaire des modèles va nous permettre de ne conserver sur animal que les tumeurs présentant des spécificités non redondantes ce qui va également réduire le nombre de souris utilisées dans la suite du projet.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Des cultures cellulaires seront entreprises à partir d'échantillon de LCR ou de biopsies cérébrales humaines. En cas de succès, les molécules seront testées in vitro pour sélectionner les plus efficaces pour une utilisation chez l'animal qui reste indispensable pour nous assurer de la bonne diffusion des molécules d'intérêt dans le parenchyme cérébral.

Réduire : Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser 4890 souris sur 5 ans. Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, les échantillons tumoraux seront systématiquement congelés en vue d'une réimplantation ultérieure. Des tests de décongélation seront réalisés pour chaque modèle sur un nombre limité de souris. Les modèles seront relancés uniquement en fonction des besoins pour une études précliniques précises. Tous les modèles seront analysés sur le plan moléculaire. S'ils ont des caractéristiques trop redondantes, ils ne seront pas utilisés chez les animaux

Raffiner ; Les animaux seront observés quotidiennement pour déceler d'éventuels signes de détresse ou de mal-être et des mesures adéquates seront prises pour arrêter immédiatement leur souffrance. Leurs conditions d'hébergement sont optimisées pour limiter leur stress, avec par exemple, l'ajout d'éléments d'enrichissement comme des rondins de bois ou de coton dans les cages.

12672 Notre projet a pour but d'améliorer l'efficacité d'une famille de molécules qui a déjà démontré des effets bénéfiques sur les deux caractéristiques physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer. La famille de molécules que nous avons développée a déjà démontré des effets bénéfiques de Réduire les lésions cérébrales et d'amélioration des fonctions cognitives chez deux modèles animaux de souris Alzheimer. Une nouvelle série de molécules dérivées des premières est plus efficace et non toxique in vitro. Notre objectif est de montrer que ces molécules sont également plus efficaces in vivo à des doses équivalentes ou plus faibles. Afin d'atteindre nos objectifs nous évaluerons 1) la biodisponibilité cérébrale après administration chronique orale et 2) les effets biologiques sur les lésions cérébrales de dégénérescence neurofibrillaire et de dépôts amyloïdes ainsi que l'amélioration des déficits cognitifs qui sont associés à la présence de ces lésions.

Notre projet répond aux exigences des 3R,

Remplacer : Seule une approche expérimentale chez l'animal permet d'envisager les répercussions d'un traitement thérapeutique sur l'aspect lésionnel et les fonctions cognitives. Les évaluations qui pourront être faites au cours du projet ne peuvent être réalisées en utilisant des alternatives aux modèles animaux.

Réduire ; Le nombre total d'animaux sur les 5 ans à venir est estimé à 1690 souris. Le projet a été conçu avec un nombre minimal d'animaux nécessaire pour assurer sa validité scientifique et statistique. Les animaux seront utilisés pour des tests cognitifs, et également pour étudier l'évolution pathologique.

Raffiner : Les animaux seront suivis précisément pour chaque protocole, pour lesquels des points limites adaptés ont été définis. Toute souffrance, angoisse ou comportement inhabituel sera pris en charge par des approches appropriées. Les animaux présentant un des points limites spécifiés pour chaque approche expérimentale seront euthanasiés dans une salle dédiée ; le tout en lien avec le responsable du bien-être animal.

12673 De nombreux patients souffrent de lésions cérébrales suite à une attaque cérébrale. Cela affecte leurs mouvements, leurs facultés cognitives, leurs émotions, leurs comportements. Les conséquences de telles lésions chez les patients peuvent aller de la rémission à une invalidité permanente, voir la mort. Il est possible que le système immunitaire et la migration des cellules immunitaires au site des lésions cérébrales jouent un rôle dans la réparation des tissus endommagés. Nous nous proposons ici de comprendre si ces cellules jouent un rôle bénéfique ou délétère. Ces études permettront de mieux comprendre l'implication des cellules immunitaires étudiées dans la résolution de lésions cérébrales.

Dans cette étude, les souris seront utilisées pour comprendre l'implication d'un type de cellules immunitaires dans les lésions cérébrales. Des lésions cérébrales seront provoquées chez la souris anesthésiée. Ces lésions seront provoquées soit chez des souris sauvages, soit chez des souris mutantes pour les cellules d'intérêt.

L'injection intraventriculaire de traceurs fluorescents permettra d'étudier le rôle de ces cellules immunitaires dans le drainage de ces traceurs dans les ganglions cervicaux.

Règle des 3R :

Remplacer : Le modèle animal est ici essentiel car il permet d'étudier un système immunitaire proche de celui de l'homme. Les nombreux modèles disponibles permettent d'étudier des facteurs spécifiques, modifiables et qui peuvent être étudiés en détail, ce qui n'est pas possible sur des tissus humains.

Réduire : De manière générale, nous utiliserons le minimum de souris nécessaires pour nos expérimentations. Pour cela, nous validerons l'effet thérapeutique de notre modèle par une approche statistique applicable à des échantillons de petites tailles : le test non paramétrique Mann-Whitney. Un total de 4130 animaux seront utilisés, de 13 lignées différentes.

Raffiner : Pour limiter la douleur, la souffrance et l'anxiété infligées, les souris seront hébergées en accord avec la loi européenne dans une enceinte dédiée, dans des cages de dimension suffisante, avec un enrichissement comprenant des nids en carton et du coton. Un analgésique sera administré pour les procédures pouvant infliger une souffrance. Une grille d'évaluation des points limites permettra d'effectuer un suivi du bien-être des animaux. Si les critères sévères sont atteints, tels qu'une perte de poids supérieure à 20% du poids initial, les souris seront euthanasiées.

12674 L'athérosclérose correspond au développement de plaques d'athérome au niveau des artères. Cette maladie est caractérisée par l'accumulation de lipides dans la paroi des gros vaisseaux et la formation de cellules spumeuses à partir de macrophages gorgés de ces lipides. Ce phénomène correspond au développement d'un état chronique d'inflammation vasculaire associé au stress oxydant. Ce dysfonctionnement conduit à terme à la survenue précoce d'événements cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral. En Europe et en France, les maladies cardiovasculaires représentent respectivement 45% et 25% de la mortalité. Plusieurs facteurs de risque sont associés à l'athérosclérose, le principal étant l'hypercholestérolémie. Cependant, ces facteurs n'expliquent pas toujours les variations interindividuelles. Selon l'hypothèse de Barker, des facteurs environnementaux agissant durant la période périnatale peuvent induire des altérations prédisposant au développement de maladies cardiovasculaires plus tard dans la vie adulte. Des études chez l'homme et l'animal montrent que la présence d'une hypercholestérolémie chez la mère pourrait avoir un impact sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance. Pendant la grossesse, le cholestérol peut augmenter jusqu'à 1,5 fois. Cette augmentation, bien que nécessaire au développement du fœtus, pourrait induire une empreinte expliquant le développement précoce de l'athérosclérose chez la descendance. Cette hypercholestérolémie gestationnelle, génère également un stress oxydant qui peut s'avérer délétère pour la descendance. Une étude récente a montré que la souris ApoE^{-/-}, génétiquement modifiée pour développer de l'athérosclérose, en développe moins quand elle est née de mère normocholestérolémique. Dans ce projet, nous émettons l'hypothèse que l'hypercholestérolémie maternelle ainsi que le stress oxydant qui l'accompagne pourraient augmenter le risque de développement de l'athérosclérose chez la descendance et qu'un

traitement, avec un antioxydant ou un hypocholestérolémiant, pendant la gestation et/ou la lactation diminuerait le développement de l'athérosclérose chez la descendance.

Lors d'une étude préliminaire, nous avons mis en évidence que le hamster nourri avec un régime hyperlipidique développe une accumulation de cholestérol dans l'aorte, réversible par une supplémentation à l'extrait liquide de spiruline (ELS). Ce dernier est riche en antioxydant notamment la phycocyanine, molécule possédant des propriétés antioxydantes. L'objectif de ce projet est d'étudier l'effet du traitement avec un antioxydant (ELS) et un hypocholestérolémiant (Colesevelam) pendant la gestation et/ou l'allaitement, sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance ApoE^{-/-}. L'utilisation de ces deux traitements nous permet de comprendre et de distinguer l'effet de l'hypercholestérolémie maternelle de celui associé au stress oxydant accompagnant celle-ci, dans le développement de l'athérosclérose de la descendance. Ainsi différents groupes de souris seront étudiés en parallèle, un groupe contrôle non traité, un groupe traité pendant la gestation et/ou la lactation soit à l'ELS (80 mg de phycocyanine/kg de poids corporel/jour) soit au Colesevelam (2% dans le régime) soit simultanément avec ELS et Colesevelam. Nous investiguerons les mécanismes potentiels impliqués dans l'effet préventif de l'athérosclérose par ces deux traitements. Nous allons également étudier les effets de ces traitements sur les transporteurs lipidiques des placentas. Le modèle d'étude est déjà mis en place au laboratoire. Cette expérience requiert 255 souris ApoE^{-/-}, soit 87 animaux adultes et nous prévoyons 168 descendants théoriques.

La règle des 3 R sera respectée :

Remplacer : Seule une étude in vivo, c'est-à-dire incluant la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu lors du développement de maladies cardiovasculaires en période périnatale, peut permettre d'atteindre l'objectif de ce projet. Aucune méthode de remplacement ne peut donc être employée.

Réduire : Le nombre de souris a été réduit au minimum pour permettre une bonne évaluation statistique d'une intervention nutritionnelle entre différents groupes indépendants sur le développement de l'athérosclérose (test ANOVA).

Raffiner : Les animaux ne subiront que très peu de contraintes et la douleur sera minimisée. Les cages seront enrichies (frisottis), les rares prélèvements de sang seront effectués au niveau de la queue ou de la veine submandibulaire sous anesthésie à l'isoflurane des animaux. La mise à mort sera effectuée par dislocation cervicale. Les souris seront surveillées quotidiennement. Dans le cas de toute modification physique ou comportementale, la surveillance sera accentuée et les souris seront soignées et/ou placées sous antidouleurs afin de minimiser toute souffrance, détresse ou inconfort. Les prélèvements de sang seront stoppés momentanément jusqu'au rétablissement de l'animal. Enfin, si l'animal ne parvenait pas à se rétablir, la mise à mort serait envisagée.

12675 Notre société développe deux types de dispositifs implantables ayant leur première application dans le traitement du diabète de type 1. Le premier dispositif permet l'encapsulation de cellules sécrétrices d'insuline, l'autre la délivrance d'insuline. Ces deux dispositifs sont principalement constitués de membranes micro- ou nanoporeuses. Les membranes utilisées actuellement ont été sélectionnées selon leur biocompatibilité chez le rat.

Actuellement, la nature des matériaux utilisés et la structure même des membranes ne permettent pas une implantation et un retrait par chirurgie mini-invasive. Afin de rendre les deux dispositifs compatibles avec ce mode d'implantation, de nouvelles membranes doivent donc être utilisées. Elles doivent avoir avec des perméabilités aux molécules d'intérêt et une sélectivité comparable aux membranes actuelles, tout en étant suffisamment flexibles pour permettre le passage dans un trocart.

Une fois les propriétés de diffusion et les propriétés mécaniques des candidats de membranes validées in vitro, l'étape suivante consistera à tester leur biocompatibilité au site extrapéritonéal, situé entre le péritoine et les muscles, qui est le site d'implantation des dispositifs complets.

Pour notre protocole, nous avons choisi le rat, qui a une taille suffisante pour permettre un accès facile au site extrapéritonéal et qui supporte bien les interventions chirurgicales. Cette étape ne peut

être réalisée que sur un modèle animal, car la réaction tissulaire au site testé est trop complexe pour être investiguée avec des modèles cellulaires. De plus, comme tout dispositif médical implantable, la sécurité de ce dernier doit être validée en études précliniques sur l'animal avant d'avoir l'autorisation de rentrer en phases cliniques. Ainsi, des portions de membrane seront implantées en extrapéritonéal chez des rats mâles (espèce : Wistar) sains pour une durée allant jusqu'à 60 jours. Les tests mécaniques et de perméabilité réalisés in vitro sur différentes membranes nous ont permis de sélectionner 6 candidats à tester in vivo : 3 candidats pour le dispositif d'encapsulation de cellules, 3 candidats pour le dispositif de délivrance de médicament. A l'issue de l'implantation des différents temps d'implantation, les membranes seront prélevées afin de réaliser des tests de diffusion et des analyses de surface par microscopie électronique à balayage. Les tissus environnants seront prélevés pour réaliser des analyses histologiques quantitatives qui feront l'objet de tests statistiques. Afin d'avoir des effectifs suffisamment importants pour réaliser ces tests statistiques, 10 rats seront utilisés par temps et candidat de membrane. Au total, cette étude nécessitera 240 rats.

Règle des 3R :

Remplacer : Le principe de remplacement ne peut être appliqué ici, car la réaction tissulaire au site extrapéritonéal met en jeu deux tissus aux structures bien différentes, qu'il n'est pas possible de reproduire via des modèles cellulaires. De plus les études permettant de constituer le dossier de demande d'étude clinique pour un dispositif implantable doivent comporter des tests de sécurité et de d'efficacité chez le petit et le gros animal. Les résultats attendus de ce protocole devraient nous permettre de sélectionner les membranes présentant la meilleure biocompatibilité pour la fabrication des nouvelles versions de nos dispositifs, compatibles avec la chirurgie mini-invasive. Ces études chez le rat permettront également de limiter le nombre de gros animaux utilisés lors des étapes suivantes.

Réduire : Le principe de Réduire est pris en compte en amont de cette étude, en éliminant directement les candidats de membrane ne remplissant pas nos critères suite aux tests in vitro de perméabilité et de résistance mécanique. Ainsi, seuls les candidats de membrane les plus prometteurs seront implantés. La surface totale de membrane implantée a été déterminée pour permettre de réaliser l'ensemble des tests nécessaires avec les échantillons implantés chez un seul animal.

Raffiner : Le respect du principe de Raffiner intervient tout d'abord au niveau des conditions d'hébergement, avec un enrichissement des cages par des cylindres en PVC rouges et l'hébergement par groupe de 3 à 5 rats par cage, de plus la température. De plus, les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture et seront hébergés en conditions d'hygrométrie et de températures contrôlés. Le Raffiner intervient également au niveau des méthodes d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire. Ainsi, l'anesthésie est réalisée au gaz, permettant un meilleur contrôle et un réveil plus rapide des animaux. En post-opératoire, l'administration d'un anti-inflammatoire permet de limiter la douleur de l'animal. Des points limites prédictifs ont également été établis, permettant d'interrompre au plus tôt les procédures, si nécessaire, afin de prévenir toute douleur ou souffrance chez les animaux. Il intervient également au niveau des tests statistiques utilisés pour analyser les données, qui permettront de faire ressortir des différences statistiques entre les groupes expérimentaux avec un minimum d'individus.

12676 L'épidémie d'obésité qui sévit à travers le monde (15,7 % des français sont considérés obèses) est liée à une augmentation de la prévalence des maladies métaboliques, tel que le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont aussi en nette progression dans les pays industrialisés, d'où la notion de maladies urbaines. En France, le taux de malades a augmenté de 60 % entre 2004 et 2012. Au cours des dernières décennies, la recherche s'est tournée vers l'analyse du microbiote intestinal et de nombreuses publications ont démontré le rôle important de la dysbiose microbienne dans le développement des maladies métaboliques et inflammatoires. Plusieurs études ont démontré que l'administration de souches probiotiques peut avoir un effet positif sur la flore intestinale, ainsi que sur certaines maladies comme les MICI et l'obésité. Au cours de ce projet, plus de 200 souches ont été isolées,

identifiées et caractérisées pour leur potentiel probiotique, et choisies sur des critères comme la résistance aux antibiotiques, la production de substances antimicrobiennes, la résistance aux conditions gastriques, ainsi que par leurs effets immunomodulateurs in vivo, sur des cellules Caco2, et ex vivo, sur des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). Après ce grand criblage, seules 7 souches sur 200 (3.5%) ont été sélectionnées pour leur grand potentiel probiotique et vont être utilisées pour les tests in vivo. L'objectif de la partie in vivo de ce projet est de tester l'effet de ces souches sur un modèle murin sain pour étudier leurs viabilités intestinales, leurs effets sur l'homéostasie intestinale, ainsi que leurs effets sur le microbiote intestinal. Selon les résultats de ce modèle murin sain, ces souches vont être testées dans un modèle inflammatoire et/ou modèle d'obésité. Respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'étude du microbiote intestinal ainsi que l'étude de l'expression des gènes responsables de l'homéostasie corporelle sur plusieurs organes dans un modèle sain, inflammé et obèse ne peut se faire que sur des animaux. Par ailleurs le modèle murin est le plus adapté pour faire ces analyses de microbiote intestinal chez des animaux sains, obèses et inflammés.

Réduire : Le nombre de souris utilisables pendant la partie in vivo, 96.5% des souches ont été éliminées grâce au criblage réalisé au départ. Ainsi les souches ayant le potentiel probiotique le plus important ont été sélectionnées, ce qui réduit automatiquement le nombre d'animaux à utiliser. Concernant la partie biostatistique et pour avoir des résultats statistiquement interprétables au niveau de l'étude de la flore intestinale, les groupes seront composés de 8 animaux. Le nombre maximal de souris testées dans ce projet ne dépassera pas 216 et peut être réduit car certaines souches peuvent n'être testées que dans l'un des deux modèles selon les résultats du modèle sain.

Raffiner : Le choix du modèle animal implique automatiquement la prise en compte des mesures de Raffiner liées au nombre de souris par cage qui respectera le confort animal. L'enrichissement des cages et l'entretien des animaux en présence de professionnels et scientifiques expérimentés est la première préoccupation des meneurs de ce projet. Le suivi quotidien des animaux 7 jours sur 7 permettra d'améliorer leurs conditions de vie en captivité en diminuant les sources de stress. Les soigner en cas de besoin par des analgésiques est un moyen d'avoir des résultats scientifiques plus fiables tout en respectant la dignité animale. Les procédures du protocole sont de classes légères ou modérées et ne présentent aucun risque pour la vie des animaux. Une maladie accidentelle ou une erreur de manipulation des animaux impliquera automatiquement l'arrêt de l'expérimentation. En conclusion, ce protocole peut aider à mieux comprendre le fonctionnement de nouvelles souches probiotiques dans des modèles murins in vivo, sur des animaux sains, inflammés et/ ou obèses. Cette expérimentation sera une base solide pour des futurs essais cliniques.

12677 L'utilisation d'animaux comme modèles expérimentaux, est un des moyens le plus complet pour comprendre les effets d'une pathologie ou d'un médicament à l'échelle de l'organisme. Quand les méthodes alternatives ne permettent pas le remplacement des animaux, la recherche scientifique peut s'orienter vers l'utilisation de rongeurs comme modèles expérimentaux ; aujourd'hui, près de 61 % de souris et près de 14 % de rats sont utilisés dans le cadre de ces recherches en Europe. Cela peut être expliqué par leur petite taille (facilité de manipulation et d'hébergement), leur espérance de vie courte, leur proximité génétique et l'expression de caractéristiques pathologiques comparables à celles de l'homme. L'ensemble de ces caractéristiques font de ces animaux un modèle de choix pour la recherche biomédicale.

Le caractère pertinent d'une étude scientifique est dépendant de la répétabilité des résultats obtenus lors d'une expérimentation, quels que soient les laboratoires et les manipulateurs. De ce fait, lorsque des animaux sont choisis pour intégrer une étude, ils se doivent tous de présenter la (ou les) pathologie(s) étudiée(s). Ces exigences sont satisfaites par le processus de sélection et de contrôle des animaux au moment de la production, dans le but de s'assurer qu'ils conviennent tous aux standards du modèle choisi. Ainsi, l'objectif de notre structure est de fournir des lignées de rongeurs avec un phénotype bien établi et répétable.

Ce projet a pour but d'optimiser la qualité des animaux produits par la mesure de la pression artérielle et de la glycémie chez le rat et la souris, en vue d'obtenir des tailles de colonies suivant l'évolution de la demande client.

Sur 5 ans, c'est un total de 2850 animaux potentiellement mesurés :

- (1) 1000 rats mesurés pour la pression artérielle dans le cadre du remplacement de nos reproducteurs afin d'assurer le maintien du phénotype de la souche de rat hypertendu (SHR)
- (2) 100 rats mesurés pour la pression artérielle permettant de répondre aux besoins clients, hors cadre de la sélection des rats SHR
- (3) 1000 souris et 750 rats mesurés pour la glycémie dans le but de répondre à une attente client.

La mesure de la pression artérielle est réalisée par un système de mesure sphygmomanométrique non invasif (système de brassard positionné au niveau de la queue de l'animal). Le suivi glycémique est réalisé par lecture au glucomètre d'un faible volume de sang (équivalent à une goutte $\approx 10 \mu\text{L}$) prélevé à l'extrémité de la queue de l'animal. Les animaux sont utilisés dans ce projet selon les différents principes de la règle des 3R :

Remplacer : sachant qu'une partie du projet vise à sélectionner nos futurs reproducteurs l'utilisation d'animaux est inévitable, et en ce qui concerne les demandes de nos clients, l'impossibilité d'avoir recours à des méthodes alternatives est justifié dans leurs projets d'étude

Réduire est respectée par la volonté du projet de sélectionner uniquement les animaux d'intérêts et par la justification des quantités d'animaux nécessaires dans les études de nos clients

Raffiner : Les méthodes d'hébergement de nos animaux sont faites selon les normes fixées par la directive 2010/63/UE ainsi que par le choix des méthodes utilisées pour mesurer la pression artérielle (méthode non invasive) et la glycémie (volume de sang nécessaire très limité). Ces manipulations sont réalisées par le même personnel compétent dans la contention et la réalisation de ces mesures, afin de limiter le stress induit par la procédure. Des points limites sont observés tout au long des procédures et une surveillance des animaux est réalisée quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur. Si des animaux présentaient une perte d'état générale sévère, ils seraient mis à mort, selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la structure chargée du bien-être animal.

12678 La lamproie marine (*Petromyzon marinus*) est une des trois espèces de lamproies européennes, toutes protégées au titre de la directive habitat faune flore 92/43/CEE. La préservation efficace de cette espèce implique une estimation fiable des effectifs d'adultes qui se reproduisent sur les frayères en rivière. Ces frayères correspondent à des zones présentant un courant supérieur à 50 cm/s, une profondeur d'environ 50 cm, et un substrat composé de galets et de graviers. Les lamproies, essentiellement les mâles, y déplacent les galets pour construire des nids constituant des cuvettes d'un à deux mètres de diamètre et quelques dizaines de centimètres de profondeur, bien visibles lors de prospection sur le terrain. Typiquement, on admet que chaque individu ne fréquente qu'un nid au cours d'une saison de reproduction, et qu'un nid est en général fréquenté par un seul couple. Ainsi, le dénombrement des nids sur une frayère permet d'estimer le nombre d'adultes reproducteurs, comme le double du nombre de nids. Un facteur correcteur est cependant appliqué car des observations montrent qu'environ 30% des nids peuvent être fréquentés par plus de deux individus, en particulier par une femelle et plusieurs mâles, correspondant à des cas de polyandrie. L'estimation du nombre d'adultes reproducteurs est ajustée pour tenir compte de cette polyandrie, mais le taux de correction est le même pour toutes les frayères. Or, une hypothèse propose que les mâles coopèreraient pour construire soit des nids plus grands et plus stables augmentant ainsi la survie des œufs qu'ils féconderont, soit plus de nids étalant ainsi le risque de destruction par érosion de la totalité de leur descendance. On peut alors prédire que la coopération, donc la polyandrie devrait être plus marquée dans les habitats moins stables (fort courant) et quand les mâles sont plus petits (moins de ressources énergétiques individuelles pour déplacer les galets). D'un point de vue théorique, l'intérêt de cette hypothèse est de proposer un mécanisme favorisant la coopération dans un cadre impliquant typiquement de la compétition intra-sexuelle. D'un point de vue appliqué, l'intérêt de cette hypothèse est que le coefficient permettant d'estimer l'effectif

d'adultes à partir du nombre de nids pourrait dépendre de l'habitat et de la composition en taille corporelle des mâles dans la population.

Dans ce contexte, les objectifs du projet sont 1) de tester l'effet de l'habitat et de la taille des mâles sur la coopération et la polyandrie, 2) tester l'effet de la coopération sur le nombre et la taille des nids construits, et 3) de mettre en place et valider un modèle d'estimation de l'effectif à partir du dénombrement des nids, de leurs caractéristiques physiques et de la distribution en taille des mâles.

L'expérience proposée se déroulera en milieu naturel, sur des sites de pontes fréquentés par la lamproie marine, où la vitesse de courant et la granulométrie seront précisément décrites. Pendant la saison de reproduction (mai-août), on échantillonnera le comportement de reproduction. Lorsque des individus seront détectés en train de construire un nid, on les comptera, on notera leurs comportements de construction de nid (nombre de galets déplacés) et de reproduction (émission de gamètes) puis on les capturera à l'épuisette. Sous anesthésie, ils seront sexés, mesurés et marqués avec des marques en plastique de type "spaghetti" insérés dans la nageoire dorsale à l'aide d'une aiguille creuse. Après cette opération (l'exondation ne durant que quelques secondes), chaque individu sera placé dans un vivier immergé dans la rivière. A son réveil, il sera relâché exactement sur le nid où il aura été collecté. En marquant chaque individu avec deux marques bicolores pouvant être placées à quatre endroits différents sur la nageoire dorsale, on peut générer un nombre de combinaisons tel que les lamproies seront par la suite reconnues individuellement par simple observation visuelle, sans avoir recours à une recapture et une manipulation. Les individus ne seront donc manipulés qu'une fois au cours de l'expérience. Cette reconnaissance individuelle permettra 1) de déterminer le nombre de nids fréquentés par chaque individu au cours de la saison, ainsi que son comportement sur ces différents nids, et 2) d'estimer l'effectif d'individus fréquentant la frayère, grâce à un modèle de capture-marquage-recapture (CMR), la recapture étant ici une simple observation sans réelle contention. Cette estimation d'effectif servira lors de la validation du modèle d'estimation basé sur le dénombrement des nids.

Des observations préliminaires sur le nombre de nids dans la zone d'étude indiquent que le marquage concernera au maximum 100 individus par an (2.5% de la taille estimée de la population de géniteurs). L'intérêt de renouveler l'opération pendant trois ans est de collecter suffisamment de données dans des situations hydrologiques contrastées, augmentant la puissance de l'analyse reliant la vitesse du courant à la probabilité de coopération entre mâles.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Le remplacement par une autre espèce ou par une approche alternative ou complètement théorique n'est pas envisageable car le comportement de la lamproie marine est précisément l'objet de l'étude.

Réduire : Ce principe n'est pas applicable dans ce projet, puisqu'il consiste en un dénombrement de populations sauvages.

Raffiner : La manipulation consistant à mesurer et marquer les lamproies est très couramment utilisée et ne prend que quelques secondes, après lesquelles les individus seront réveillés puis replacés dans leur milieu naturel. Des expériences antérieures montrent que les lamproies reprennent rapidement un comportement normal après ce type d'opération.

12679 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont un enjeu majeur de santé publique. Ils sont responsables de la troisième cause de mortalité et de la première cause de handicap acquis dans les pays occidentaux. La majorité des AVC est causée par la présence d'un caillot dans une artère du cerveau, on parle alors d'infarctus cérébral ischémique (ou AVC ischémique). Le seul traitement possible est de déboucher l'artère occluse : c'est la reperfusion. Bien que bénéfique, la reperfusion provoque également des lésions supplémentaires incluant la mort des cellules du cerveau. Cette mort cellulaire est due en partie à l'ouverture d'un pore au niveau de la mitochondrie, cœur énergétique de la cellule, appelé "pore de transition de perméabilité mitochondrial". Il est connu en cardiologie depuis une trentaine d'année qu'une succession de cycles d'occlusion et de reperfusion précédant directement l'épisode ischémique permet de réduire la taille de l'infarctus, notamment en empêchant l'ouverture de ce pore. Cette stratégie thérapeutique est connue sous le nom de "pré-

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

Notre projet a pour objectif général de déterminer le potentiel effet neuroprotecteur de la CsA sur la taille de l'infarctus et sur le pronostic neurofonctionnel, ainsi son mécanisme, au cours de l'AVC ischémique. Nous travaillerons avec un modèle murin d'ischémie-reperfusion cérébrale : il s'agit d'un modèle préclinique de référence de l'AVC largement utilisé dans la littérature et maîtrisé par notre équipe. Nous étudierons ainsi l'effet de la CsA administrée soit avant l'occlusion (pré-conditionnement) soit juste avant la reperfusion (post-conditionnement) sur la fonction des mitochondries puis après 1 jour de reperfusion sur cette même fonction et sur la taille de l'infarctus cérébral. Ce projet comporte donc 2 procédures pour un total de 189 souris sur 3 ans.

Conformité à la règle des 3R

Remplacer : Notre étude ayant pour but d'évaluer l'effet neuroprotecteur de la CsA, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire. De plus, celle-ci s'appuie sur des résultats préliminaires obtenus *in vitro* sur cellules neuronales.

Réduire : Le nombre minimal et suffisant d'animaux a été estimé grâce à une pré-étude tenant en compte la mortalité liée à l'intervention chirurgicale.

Raffiner : Dans le but d'améliorer le bien-être des animaux et ce, dès leur arrivée dans notre animalerie, un enrichissement de milieu est mis en place et renouvelé très régulièrement aussi bien avant l'expérimentation qu'en soins post-opératoires. Afin de supprimer la souffrance et la douleur, la chirurgie est entièrement réalisée sous anesthésie générale avec prémédication analgésique et anesthésique locale adaptée. En soins post-opératoires, nourriture et boisson sous forme gélifiée seront mises à disposition de l'animal en plus de la nourriture et boisson habituelles, les groupes sociaux seront conservés et un protocole analgésique continu sera mis en place. De plus, l'ischémie cérébrale pouvant entraîner des déficits neurologiques avec une diminution des capacités locomotrices de l'animal, les animaux feront l'objet d'un suivi renforcé après l'opération en s'appuyant sur une fiche d'observation permettant de mettre en évidence un éventuel point limite et d'agir en conséquence avec l'avis du vétérinaire référent.

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

12680 La douleur est un processus physiologique nécessaire à la survie. Elle prévient l'organisme d'un danger imminent et permet la mise en œuvre de réponses adaptées qui visent à en limiter les effets délétères. Cependant, lorsque la douleur est chronique ou persistante, elle devient alors pathologique car elle n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire une extrême souffrance. C'est notamment le cas des douleurs neuropathiques ou inflammatoires qui apparaissent suite à une lésion ou inflammation du système nerveux périphérique ou central. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il est donc essentiel de découvrir de nouveaux traitements, et pour ce faire, de disséquer les mécanismes responsables de la genèse d'une douleur chronique.

Parmi les symptômes douloureux, il existe l'allodynie qui correspond à une douleur provoquée par une stimulation normalement non douloureuse qui peut être déclenchée suite à une inflammation. En temps normal, les informations tactiles et douloureuses n'aboutissent pas au même niveau de la moelle épinière ou du tronc cérébral, les deux modalités sensorielles (tact et douleur) sont donc normalement séparées. En conditions pathologiques, par exemple lors d'une allodynie, l'information

tactile devient capable d'activer des neurones nociceptifs, grâce à un circuit qui implique plusieurs cellules. Le tact va alors devenir douleur (allodynie mécanique). Ce processus va provoquer l'activation de plusieurs populations neuronales et implique également une population spécifique de cellules gliales, les astrocytes. Cependant, peu de choses sont connues sur ces cellules et leur implication dans le déclenchement de l'allodynie lors d'une inflammation. L'objectif général de ce projet va consister à étudier l'implication des astrocytes et plus précisément des canaux potassiques astrocytaires dans l'allodynie. Cette étude présente un intérêt en recherche fondamentale, et également un intérêt plus appliqué en permettant éventuellement de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques visant à diminuer les douleurs pathologiques chez l'homme.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 244 rats sur 10 mois.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Comprendre la physiologie de la douleur nécessite l'utilisation d'animaux. Ainsi, aucune méthode alternative actuelle ne permet de remplacer les protocoles nécessaires à la réalisation de ce projet.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au maximum. Ce nombre sera diminué au cours des étapes si les résultats obtenus s'avèrent ne pas être significatifs.

Raffiner : Au cours des procédures expérimentales (injections), les animaux seront anesthésiés. Et pendant l'expérimentation, une observation régulière des points limites tels qu'une perte de poids et/ou un déficit moteur sera effectuée. En cas d'atteinte de ces points, l'animal sera retiré de l'expérimentation. Enfin, les animaux seront 3 par cage de 800 cm² (enrichissement social) dans l'animalerie thermorégulées (22±1 °C), avec hygrométrie contrôlée et cycle de lumière inversé (lumière de 19h à 7h). L'accès à la nourriture et à l'eau sera ad libitum et un changement de litière sera effectué 2 fois par semaine.

12681 Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) sont définies comme des cellules caractérisées par l'expression de marqueurs phénotypiques non spécifiques et leur potentiel de différenciation en cellules de la voie mésodermique. Les sources disponibles de cellules stromales mésenchymateuses sont multiples, incluant les tissus fœtaux et les tissus adultes tels que la moelle osseuse et le tissu adipeux. L'intérêt de leur utilisation chez l'homme est en cours d'évaluation dans des pathologies dysimmunitaires comme la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD : Graft versus Host Disease), mais aussi inflammatoires comme l'infarctus du myocarde, le diabète ou des affections neurodégénératives. Les CSM ont une action immunosuppressive sur le système immunitaire qui a été démontrée dans certains modèles animaux. Les mécanismes pertinents pour leur efficacité thérapeutique ne sont pas encore bien définis. Pour cela, nous souhaitons étudier l'effet immunomodulateurs des CSM et chercher un mécanisme responsable de cet effet.

Notre précédent projet nous a permis de mettre en place et de caractériser un modèle murin portant la GvHD. L'objectif de ce nouveau projet est de valider in vivo, sur ce modèle de GvHD préalablement établi, l'efficacité thérapeutique de différents types de CSM et leurs interactions avec les cellules immunitaires humaines dans les organes cibles de l'animal.

La conformité avec les exigences de Remplacer, de Réduire et de Raffiner de la règle des 3R est appliquée :

- Remplacer : En biologie immunologique, il est impossible de récapituler l'ensemble des événements conduisant la réaction immunitaire dans un système cellulaire. Plusieurs processus régissant les interactions immunitaires ne sont pas analysables in vitro. Il est donc nécessaire d'établir si les CSM sont efficaces dans le contexte de l'animal entier portant une maladie. De plus, la validation de résultats obtenus in vitro sur un ou plusieurs modèles animaux est indispensable en vue d'une application clinique. La souris est un petit mammifère et possède donc de nombreuses caractéristiques physiopathologiques communes avec l'homme, indispensables pour l'extrapolation des résultats. Nous avons choisi d'utiliser des souris profondément immunodéficientes pour favoriser la prise de xénogreffe de cellules immunitaires humaines.

- Réduire : Le choix des conditions expérimentales est fixé en lien avec les questions scientifiques du projet et les principes de réduction. Différents paramètres sont pris en compte tels que les types

de greffon humain, les types et les doses de CSM. Les procédures expérimentales sont rigoureusement planifiées afin de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaire. Pour atteindre les objectifs scientifiques du projet, un nombre de 270 souris sera utilisé auxquelles s'ajoutent 40 souris reproductrices.

- Raffiner : Les points limites et des critères d'arrêt sont établis de façon à détecter le plus précocement possible les signes de souffrance des animaux en fonction de l'objectif de l'expérimentation. Ceux-ci sont basés sur les symptômes cliniques de la GvHD adaptés à la souris. Les animaux recevront une anesthésie et/ou analgésie adaptée à chaque procédure expérimentale.

12682 L'épilepsie est un trouble chronique du cerveau touchant plus de 50 millions de personnes dans le monde. Elle se caractérise par la survenue de crises récurrentes se manifestant par des tremblements involontaires ou une perte de conscience. Ces crises sont le signe d'une synchronisation excessive des décharges des neurones dont l'origine peut être congénitale ou suite à un traumatisme. De nombreux traitements existent mais 40% des adultes ont des crises pharmacorésistantes, c'est à dire qu'elles ne peuvent pas être atténuées par des médicaments, l'enjeu est donc d'améliorer les techniques de chirurgies de suppression de foyer épileptique comme l'exérèse et la thermocoagulation. Ces deux techniques reposent sur l'utilisation d'électrodes lors de la chirurgie : un autre point important à améliorer est donc l'histocompatibilité des électrodes avec le tissu nerveux. L'enjeu majeur est de ne limiter la destruction du foyer épileptique qu'au tissu épileptogène, en évitant de toucher le tissu sain.

Notre groupe se propose donc d'évaluer les techniques utilisées aujourd'hui dans le but de les améliorer mais aussi tester l'histocompatibilité des implants et leur efficacité thérapeutique. Ce projet, réalisé chez la souris, se divise en trois grands axes : - Amélioration de la détection du foyer épileptique - Thermocoagulation du foyer épileptique - Analyse de la compatibilité Electrode et tissu cérébral.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'utilisation de souris est indispensable afin de voir comment le cerveau réagit à ces différentes techniques.

Réduire : Dans cette étude nous allons utiliser 1050 souris qui seront réparties en lots selon nos objectifs, nous permettant par la suite de tirer des conclusions pertinentes. Dans notre étude, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, afin de garder une puissance statistique dans le traitement des résultats. Les données que nous récolterons seront partagées avec une autre équipe de notre laboratoire afin de pouvoir réduire le nombre d'animaux à long terme.

Raffiner : Ainsi, de manière à s'assurer du bien-être des animaux, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance en mettant en place des protocoles d'anesthésie et analgésie à chaque fois que cela est possible. En particulier, nous mettrons en place des moyens afin réduire au maximum la douleur, l'angoisse et le stress des animaux en définissant des points limites précoces et des critères d'arrêt. Nous donnerons une importance capitale aux conditions d'hébergement, d'élevage et de soin en enrichissant le milieu par exemple.

12683 Ce projet couvre l'ensemble des essais réalisés dans le cadre d'une mise au point de technique ou de formation interne sur l'espèce 'miniporc,' nécessaires à la réalisation des études faites dans l'établissement, études pour lesquelles il n'existe pas d'alternative validée scientifiquement, éthiquement et réglementairement à l'utilisation d'animaux. Ces études sont réalisées conformément aux principes éthiques. Tout expérimentateur est amené à acquérir, entretenir ou perfectionner une technique impliquant les modèles animaux. Ce projet est dédié à l'entraînement du personnel sur les gestes nécessaires à la bonne réalisation des procédures expérimentales, sur le miniporc. Ces gestes sont acquis à l'occasion de formations, animées par des formateurs soit internes à l'entreprise (transmission des compétences, tutorat) ou externes (mise au point de technique, harmonisation des méthodes d'administration et de prélèvement etc...).

Respect de la règle des 3R

Remplacer : L'utilisation du miniporc est indispensable car ce projet s'inscrit dans l'obligation réglementaire décrite dans l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques. Il permet de s'assurer et de valider la compétence du personnel. Un entraînement régulier et une bonne compétence du personnel, sont indispensables à une réalisation efficace des études, augmentant la fiabilité des résultats, et respectant le bien-être animal par la pratique de gestes maîtrisés.

Réduire : On peut estimer le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de la formation/entretien de la formation du personnel et/ou mise au point de technique à un maximum de 20 miniporcs par an (donc un maximum de 100 pour le projet). Ces mises au point/formations se faisant de manière occasionnelle, les animaux pourront être réutilisés, en accord avec les principes de la réglementation et sous contrôle des structures éthiques. Dans de rares cas (par exemple, formation aux méthodes d'euthanasie et/ou prélèvements d'organes), les animaux seront euthanasiés mais cet apprentissage sera généralement prévu sur des animaux déjà inclus dans un autre projet.

Raffiner : En accord avec les recommandations des structures éthiques, le type de geste est choisi et adapté en fonction des besoins d'apprentissage et/ou de perfectionnement. L'apprentissage des techniques d'examen, d'administration et de prélèvement se fera dans un 1er temps, si nécessaire, sous anesthésie puis sur animaux vigiles. Les techniques d'administration chez le miniporc incluent les administrations per os (PO), sous-cutanée (SC), intradermique (ID), intramusculaire (IM) et intraveineuse (IV).

12684 La fibrillation auriculaire (FA) est la forme la plus fréquente des troubles du rythme cardiaque touchant 1 à 2 % de la population mondiale, 250 000 personnes supplémentaires chaque année en France. Son incidence augmentant avec l'âge, on estime que sa prévalence sera multipliée par 2,5 d'ici les 50 prochaines années du fait de l'allongement de la vie dans les pays industrialisés. Cette pathologie cardiaque représente donc un problème de santé publique majeur. Elle résulte d'une activité électrique chaotique et d'une perte de fonction du tissu atrial qui provoque une contraction anarchique et asynchrone du myocarde, et est associée à un risque accru d'accidents vasculaires cérébraux, d'infarctus du myocarde et d'insuffisance cardiaque.

Les thérapies actuelles sont basées sur des traitements anti-arythmiques et anticoagulants et sur l'ablation par radiofréquence des zones arythmogènes, cependant souvent inefficaces dans les cas de FA persistante et permanente. En cas d'échec de ces traitements, un stimulateur cardiaque (pacemaker) est alors implanté, nécessitant une intervention invasive et un suivi régulier du patient. Malgré des avancées importantes sur les connaissances des mécanismes cellulaires liés à la FA, une meilleure compréhension des voies de signalisation moléculaires reste indispensable afin de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de la FA.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce projet de recherche de mettre en évidence de nouvelles voies de signalisation impliquées dans la FA afin de définir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour cela, des souris transgéniques surexprimant une protéine, ou knock-out pour un gène donné ou mutée spécifiquement sur un gène identifié comme muté chez l'homme dans la pathologie, seront utilisées afin de définir l'implication de ces modifications dans la FA. 410 animaux seront utilisés afin de tester leur susceptibilité à la FA par la technique de stimulation transoesophagienne sous anesthésie (Procédure 1) après injection ou non d'une drogue par voie intrapéritonéale visant à favoriser ou inhiber l'apparition de la FA. Ceci permettra de moduler l'effet des modifications génétiques présentes chez les animaux utilisés et de tester le potentiel thérapeutique de nouvelles drogues. L'imagerie par « micro computed tomographe » (microCT) ou en échographie (procédure 2) permettra de déterminer si les résultats observés lors de la procédure 1 sont liés à une modification de fonction et/ou de la structure cardiaque.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Le remplacement de ces animaux n'est actuellement pas possible. Les modèles de souris transgéniques sont nombreux et permettent d'étudier l'effet de ces modifications in vivo.

Réduire : Le nombre d'animaux a été évalué grâce à l'étude de précédentes publications puis a été réduit au maximum pour permettre l'obtention de résultats fiables. Cette Réduire est possible par le fait d'utiliser les mêmes animaux lors de la stimulation transoesophagienne (procédure 1) et pour les analyses en imagerie « micro computed tomography » (microCT) ou en échographie (Procédure 2) après 1 semaine minimum de repos.

Raffiner Le Raffiner du projet et le respect du bien-être animal reposent sur plusieurs mesures :

- les animaux sont hébergés dans des locaux agréés et bénéficient de soins quotidiens dispensés par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal
- les animaux sont habitués au personnel animalier afin de limiter tout stress
- une surveillance quotidienne est assurée
- les animaux sont hébergés en groupes sociaux ce qui leur permet d'exprimer des comportements naturels
- ils disposent d'enrichissements adaptés (litière, nid de cellulose)
- des points limites et des critères d'arrêt précis sont définis ; si l'animal présente un signe de souffrance, des mesures adaptées sont mises en place immédiatement (ajout d'analgésique ou euthanasie par exemple).

12685 D'origine infectieuse ou liées à la consommation excessive d'alcool ou de régime alimentaire riche en graisses, les maladies du foie deviennent souvent chroniques avec un risque de développement de cancer du foie grave et préoccupant en terme de santé publique. Afin d'améliorer la connaissance de ces maladies, notre équipe se consacre à la caractérisation des facteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement et la régulation de ces maladies du foie que l'on appelle hépatites. L'importance d'un facteur de régulation de la réponse inflammatoire, l'IL-18 BP, dans l'hépatite virale chez l'homme a été identifiée et des souris déficientes ont été générées pour le gène codant ce facteur IL-18BP. Notre projet collaboratif est de soumettre ces souris à une hépatite virale murine pour comprendre le rôle de ce facteur. Les animaux infectés seront étudiés pendant 5 jours. Les organes prélevés (foie et cerveau) seront analysés par différentes méthodes pour quantifier l'atteinte hépatique et cérébrale et l'avancée des processus de défense immunitaire du foie. Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué au nombre de 552. Ce travail permettra de préciser du facteur IL-18 BP dans la mise en place de la maladie « hépatite virale » chez la souris. A terme, les données de ce travail pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies de traitement des maladies du foie. Nous avons pensé ce protocole en suivant la règle des 3R

Remplacer : Il faut noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer de telles études qui englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique, et que seule l'expérimentation animale permet un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces et permet d'étudier la réponse physiologique d'un individu déficient pour une molécule d'intérêt pour évaluer son rôle.

Réduire : Nous avons réduit le nombre de souris à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats ; et nous avons envisagé plusieurs mesures sur les échantillons prélevés au niveau des 2 organes touchés par la maladie pour ainsi récolter un maximum d'informations qui viendront compléter celles déjà obtenues.

Raffiner Nous avons raffiné le protocole en prenant soin d'ajouter dans la cage des souris infectées un bloc de gélose humide pour leur permettre de se restaurer alors qu'elles auront une fièvre élevée du fait de l'infection virale. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt afin d'éviter toute souffrance tout au long de la vie des animaux.

12686 Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment observé chez les femmes en France et reste la première cause de décès par cancer avec plus de 11 000 décès en 2015. 70% des patientes présentent un cancer du sein hormonodépendant dont le traitement de référence est l'hormonothérapie. Cependant malgré l'efficacité de ces molécules, la résistance à ces traitements

constitue un problème majeur de santé publique. De nombreuses études ont montré que la présence de cellules souches cancéreuses ou l'activation de certaines voies de signalisation sont impliquées dans la résistance à l'hormonothérapie. Nos expériences sur des lignées mammaires ont montré que le ciblage de cette voie de signalisation seul ou en association avec un inhibiteur des cellules souches cancéreuses apportait un réel bénéfice quant à l'éradication des cellules cancéreuses que ce soit in vitro ou in vivo dans un modèle animal. Nous souhaitons maintenant transposer ces résultats à des cellules issues de patientes atteintes de cancer du sein en vue de réaliser un traitement ciblé et personnalisé chez les patients.

Dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'oncogénèse est un modèle intégré qui fait intervenir un grand nombre de mécanismes physiologiques et de tissus avoisinants qui ne peuvent être modélisés in vitro. Nous devons donc avoir recours à un modèle physiologique complet et fonctionnel.

Réduire : Nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. La croissance tumorale des cellules greffées sera suivie de manière longitudinale tout au long de l'expérience ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés. Nous aurons besoin pour réaliser l'ensemble de nos expériences de 225 souris immunodéficientes sur 2 ans.

Raffiner : Le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort, les animaux seront hébergés en groupe et l'enrichissement de leur milieu de vie sera systématique. Les animaux recevront une surveillance quotidienne et des soins adaptés : administration d'analgésiques et anesthésiques en pré et/ou postopératoire, mesure hebdomadaire du poids des souris et du volume tumoral, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt.

12687 La fécondation in vitro (FIV) est une technique de reproduction assistée permettant d'obtenir la fécondation d'un ovocyte par sa mise en contact in vitro avec un spermatozoïde fécondant. Cette technique est utilisée dans différentes espèces (Humain, Bovin, souris) avec des objectifs multiples. Par exemple, chez l'humain, elle permet aux couples à infécondité persistante à obtenir une descendance ; chez le bovin, elle permet de mieux valoriser la génétique femelle grâce à l'augmentation du nombre de descendants.

Dans le domaine expérimental, la FIV est un excellent outil de Réduire du nombre d'animaux utilisés expérimentalement car, grâce au remplacement d'ovocytes récupérés sur des vaches vivantes par des ovocytes récupérés post mortem dans des abattoirs commerciaux, elle permet d'étudier les premières étapes du développement in vitro sans avoir recours à des animaux vivants. Cependant, depuis plusieurs années, les chercheurs observent un taux de naissance obtenu avec des embryons produits in vitro (PIV) d'environ 20% inférieur à celui obtenu avec les embryons produits in vivo.

Récemment, grâce à l'étude des 7 premiers jours de vie in vitro, nous avons démontré que des embryons ayant une apparence identique n'empruntent pas les mêmes voies pour arriver à cette même apparence. Notre hypothèse est que des voies différentes de développement peuvent aboutir à des capacités différentes des embryons PIV à interagir avec l'utérus pour établir une gestation. Si notre hypothèse est correcte, nous pourrions établir un meilleur système de sélection de ces embryons avant le transfert embryonnaire. In fine, nous pourrions identifier ceux avec forte chance d'établir une gestation et/ou mieux raisonner les accouplements embryon-receveuse afin d'obtenir un taux de gestation optimal et réduire le nombre de vaches receveuses inutilement utilisées dans des études expérimentales et sur les fermes commerciales.

Cette étape de l'expérimentation vise donc à établir le taux de gestation obtenu avec des embryons caractérisés à partir de films produits pendant la culture in vitro. Ces résultats enrichiront le modèle de caractérisation in vitro afin d'identifier des embryons avec un meilleur potentiel de gestation. Les effectifs prévus sont de 150 femelles, à raison de 30 femelles par an sur 5 ans.

Le principe des 3R a été pris en compte dans la conception du projet :

Remplacer : pour la production d'embryons : la récolte d'ovocytes in vivo sur des vaches vivantes a été remplacée par celle d'ovocytes issus d'ovaires récupérés post mortem dans des abattoirs

commerciaux. Il n'existe actuellement aucune alternative in vitro mimant l'environnement utérin pour étudier le phénomène de la gestation.

Réduire : les effectifs utilisés sont issus d'un compromis entre puissance du dispositif et le nombre d'animaux disponibles.

Raffiner : afin de minimiser la douleur, les prises de sang nécessaires au protocole seront réalisées au niveau de la queue des animaux, sur une période restreinte et espacée d'au moins 3 jours. Une anesthésie épidurale permettra d'éliminer toute sensation douloureuse lors du transfert embryonnaire. Les manipulations seront réalisées dans des conditions adéquates de contention. Les conditions d'hébergement, d'alimentation, de prophylaxie et de traitement des animaux ne sont pas modifiées par la mise en œuvre du projet et restent conformes aux conditions classiques d'élevage.

12688 Le risque de mort subite (ou SUDEP pour Sudden and Unexpected Death in Epileptic Patients) est trois fois plus élevée chez les patients épileptiques que chez une personne saine. Il est maintenant certain qu'une mort subite chez un patient épileptique est toujours précédée d'une crise convulsive généralisée, manifestation spectaculaire bien connue de la crise épileptique. Les facteurs de risques de la SUDEP semblent relever d'une implication cardiaque, respiratoire et cérébrale. Mais il n'est pas connu si le fait de faire une crise convulsive généralisée non létale augmente la probabilité que la prochaine crise le soit. Notre projet vise à lever cette hypothèse sur un modèle souris de SUDEP en induisant des crises d'épilepsie plusieurs jours consécutifs sur des mêmes sujets. Il existe un modèle de SUDEP chez la souris correspondant à une crise épileptique induite en appliquant un stimulus sonore particulier qui peut être possiblement suivie du décès (crise audiogène). Notre projet consiste à induire 5 convulsions généralisées durant 5 jours consécutifs sur des animaux et d'observer si la létalité augmente en fonction des jours. Car il faut savoir qu'il est possible de diagnostiquer le caractère létal de la crise tout en sauvant l'animal dans les quelques secondes qui suivent la crise en mettant ces animaux sous respirateur. Chaque animal sera donc testé à la crise audiogène 5 jours consécutifs et sauvés si besoin était pour assurer le bon déroulement du protocole. Ainsi, nous pourrions quantifier l'évolution du pourcentage de décès en fonction du nombre de crises déjà présentées.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in-vitro en remplacement de l'approche in-vivo dans ce projet.

Réduire : Nous souhaitons inclure dans ce projet, 205 souris qui seront testées durant 5 jours. Ce chiffre est motivé par le fait qu'il s'agit d'une variable qualitative (décès ou non) et donc un plus grand nombre d'animaux est nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement fiables.

Raffiner : Le Raffiner des procédures a été pris en compte pour limiter la souffrance de l'animal avec une détermination précise des points limites et des critères d'arrêt.

12689 La thérapie génique consiste à introduire du matériel génétique fonctionnel (via un vecteur viral) dans un organisme où le gène altéré (muté) est à l'origine d'une pathologie. Notre étude vise à élaborer une thérapie génique dans le cadre des Mecp2pathies (altérations du gène MECP2). Ce gène est impliqué dans la mise en place et le bon fonctionnement du cerveau. Les jeunes garçons présentent des encéphalopathies sévères et survivent environ 8 mois. Les filles présentent un tableau clinique appelé syndrome de Rett (RTT). Le développement est normal jusqu'à 6 à 18 mois puis l'évolution clinique consiste en une perte des acquis (marche, langage), une déficience intellectuelle sévère, des troubles notamment respiratoires et moteurs, et ce syndrome conduit à un décès prématuré. Le RTT est une maladie rare (1 naissance sur 30000). La majorité des cas apparaissent spontanément sans antécédent familial. La prévalence de ce syndrome ne changera donc pas et à l'heure actuelle, il n'y a aucun traitement curatif. Néanmoins, une étude a montré que l'expression tardive de Mecp2 chez des souris déficientes pour ce gène et sévèrement atteintes, permet la réversibilité complète des symptômes, ce qui donne beaucoup d'espoir pour les patientes. Les études de thérapie génique réalisées par nos concurrents se font en préventif, sur des animaux

avant même l'apparition des premiers symptômes. Dans le cadre d'une recherche translationnelle, le point innovant de notre recherche préclinique est d'injecter un vecteur viral codant pour *Mecp2* chez des souris qui commencent à développer la pathologie.

Nous utilisons deux modèles murins de la pathologie : le premier est un modèle knock-out pour *Mecp2* (absence complète du gène) et le second est le modèle knock-in T158M (mutation remplaçant la thréonine en position 158 par une méthionine / mutation la plus courante chez les filles Rett).

Les vecteurs viraux utilisés pour la thérapie génique sont des virus adéno-associés, qui seront injectés dans la circulation sanguine afin que le transfert à l'Homme soit facilité. Le premier vecteur viral testé sera l'AAV9-MCO (codon-optimisé de *Mecp2*) dont les effets positifs ont été décrits au niveau comportemental. Par ailleurs, peu de modifications anatomiques cérébrales majeures ont été observées chez les souris atteintes de *Mecp2* pathies. Toutefois les neurones sont moins arborisés et moins connectés. La protéine *Mecp2* étant connue pour réguler directement le facteur de croissance neuronal BDNF, nous avons donc fait le choix d'utiliser un deuxième vecteur viral, l'AAV9-BDNF afin d'essayer de favoriser la croissance des neurones dépourvus de *Mecp2*.

Étant donné le caractère ubiquitaire de *Mecp2*, l'infection de toutes les structures du cerveau est un enjeu majeur du traitement mais aussi l'un des plus complexes à atteindre. En effet, la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE), d'ordinaire protectrice pour le cerveau, empêche le passage du vecteur. Il est donc nécessaire d'y réaliser une ouverture. Nous utiliserons donc une méthode de perméabilisation temporaire de cette BHE (technologie actuellement utilisée chez l'Homme) afin d'augmenter la quantité de vecteurs viraux qui atteint le cerveau des souris malades.

Pour l'hébergement, les cages avec de la litière propre, enrichies avec un dôme en carton, sont placées dans un environnement calme avec un maximum de 5 souris par cage. L'eau et la nourriture sont données ad libitum. Par ailleurs, nous surveillons l'aspect général des animaux afin de déceler toute douleur ou mal-être de nos animaux. En fin de procédure 5, les animaux utilisés sont euthanasiés selon la réglementation.

Application de la règle des 3R :

Remplacer : Aucune méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivants n'est susceptible de répondre aux objectifs du projet. Le passage au modèle in vivo est une étape indispensable avant d'envisager un essai thérapeutique chez l'Homme.

Réduire : Cette étude utilisera 576 animaux au total, répartis, entre mâles et femelles, placés et traités, KO et KI et pour un projet qui durera 5 ans. Le nombre d'animaux utilisé sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat.

Raffiner : L'hébergement (nourriture ad libitum, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe) sera adapté aux besoins physiologiques des animaux et permettra l'expression de leur gamme normale de comportements. Des points limites clairs seront définis et les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils atteindront les critères d'interruption.

12690 Il a été prouvé scientifiquement qu'une greffe allo-génique (de même espèce) ou xéno-génique (deux espèces différentes) peut impliquer deux réactions purement immunologiques : la première est la maladie de greffon contre l'hôte GvHD (un effet majeur mais indésirable) et la deuxième réaction mineure mais très positive GvL (Graft Versus Leukemia ou greffon contre la leucémie, qui est la réaction immunologique des lymphocytes T immunocompétentes contenant dans le greffon contre les cellules tumorales de receveur).

Dans le but d'évaluer le potentiel thérapeutique d'anticorps monoclonaux sur l'effet greffon contre la leucémie (GvL) et d'en sélectionner un, nous testons in vivo ces candidats médicamenteux en model GvT (Graft versus Tumor) des souris NSG.

Ces anticorps monoclonaux ciblent un récepteur membranaire exprimé sur les leucocytes humains. Ils ont été générés et validés in vitro. Ces différents tests ont permis de sélectionner 2 candidats, mais des tests in vivo sont nécessaires. Pour pouvoir envisager des essais cliniques nous devons

tester ces anticorps dans des modèles in vivo dans le contexte d'une GVT qui fait l'objet de cette étude.

Nous avons modélisé cette réaction GvL en modèle GvT (Graft versus Tumor) sur des souris NSG. Dans ce modèle, nous injecterons en sous cutanée des souris NSG avec une lignée tumorale déjà définie. Lorsque les tumeurs seront détectables (quelques jours après implantation), nous injecterons des PBMCS humains de sujets sains avec les anticorps monoclonaux à tester.

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit :

Remplacer : des études fonctionnelles ont été réalisées in vitro à partir de cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études in vivo. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immuno-régulatrice de la molécule dans un modèle in vivo proche de l'Homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique est le modèle de souris dites « humanisées ».

Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 25, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les souris seront divisées en 4 groupes (25 souris/groupe). Le groupe témoin recevra un isotype contrôle, les autres groupes seront traités avec les anticorps d'intérêt. Le nombre de groupes a été réfléchi afin d'avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total des animaux est de 100.

Raffiner : Afin de respecter le bien-être animal, les souris vont être 3-5 souris par cage, avec des moyens d'enrichissement (petit bout de papiers et tunnel). Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. L'euthanasie des animaux sera effectuée par inhalation d'isoflurane en surdose suivie par une dislocation cervicale.

Un prélèvement sanguin sera réalisé tous les 15 jours sur animaux anesthésiés avec un mélange gazeux (isoflurane/oxygène) et surveillés jusqu'à leur réveil complet.

Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids et le score clinique pour diagnostiquer le développement de la GVHD (Graft versus Host Disease ou greffon contre l'hôte, qui est une réaction due à la réaction des lymphocytes T contenant dans le greffon contre les cellules de receveur) ainsi que le rejet de la tumeur. Des prélèvements sanguins seront effectués tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG. Tous les animaux traités avec les molécules et ceux du groupe contrôle seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de GVT, et par immuno-histologie pour étudier les conséquences de la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique des anticorps testés sur les réponses immunes intervenant dans des contextes de GVT et de mieux comprendre ses mécanismes d'action par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées versus souris contrôles. La validation de ces molécules dans ce modèle préclinique de souris humanisées est une étape indispensable pour évaluer l'efficacité de ces anticorps avant de passer aux tests cliniques.

- 12691** La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des dystrophies musculaires (1 garçon nouveau-né sur 3500). C'est une maladie génétique récessive liée à l'X, résultant d'une mutation sur le gène de la dystrophine à l'origine de l'absence de la protéine dans les fibres musculaires. Ceci entraîne une dégénérescence des fibres puis le remplacement du muscle par du tissu fibreux et adipeux. Cliniquement, une atrophie et une faiblesse musculaire sont observées conduisant au décès des patients vers l'âge de 20-30 ans. Il n'existe aucun traitement curatif de la DMD à ce jour.

La thérapie cellulaire fait partie des orientations thérapeutiques prometteuses. L'identification récente de plusieurs populations de cellules souches au sein de tissus adultes et la démonstration de leur potentiel myogénique offrent des perspectives nouvelles.

Notre équipe a isolée une population de cellules souches dérivées du muscle squelettique (cellules MuStem) et établi la preuve de son efficacité thérapeutique chez le chien dystrophique (Golden Retriever Muscular Dystrophy). Un programme de recherche préclinique a ensuite abouti à l'isolement de cette population chez l'Homme (hMuStem), présentant des propriétés phénotypiques et comportementales in vitro similaires à celles décrites pour la population canine.

L'objectif du projet est de déterminer sur le plan préclinique l'efficacité et l'innocuité de l'administration intraveineuse (IV) de la population hMuStem chez le rat DMDmdx. Ce modèle a été généré en 2014 par un consortium de laboratoires et se révèle être un très bon modèle animal de la DMD pouvant se substituer au modèle canin (modèle gros animal difficile à manipuler et établissement de cohortes statistiquement significatives quasi impossible), au moins pour réaliser les 1ères phases d'évaluation de l'efficacité de nouveaux produits thérapeutiques. Notre étude de biodistribution et d'évaluation du potentiel de régénération musculaire de la population cellulaire Mustem humaine se fera donc chez ce modèle.

Un maximum de 105 rats sera inclus dans ce projet, qui se déroulera en 4 phases.

Phase 1 : Validation de l'innocuité et de l'efficacité chez le rat DMD d'un protocole d'immunosuppression associant Tacrolimus et Prednisolone (immunosuppression indispensable puisqu'il s'agit de tester des cellules humaines). 5 groupes de 5 rats DMD maximum recevront respectivement la prednisolone seule, le tacrolimus seul par voie orale ou via une capsule introduite en sous-cutané, une association de tacrolimus et prednisolone ou aucun immunosuppresseur (groupe « mock ») avant de recevoir une injection intramusculaire de cellules hMustem une semaine après. La moitié des rats sera euthanasiée une semaine après injection des cellules pour valider la qualité de l'immunosuppression et l'autre moitié 6 semaines après pour valider la persistance des cellules injectées.

Phase 2 : Etude de la biodistribution immédiate des cellules hMustem après administration IV : 6 rats DMDmdx maximum seront mis sous traitement corticoïdes une semaine avant injection des cellules hMustem et euthanasiés 36h après. Un à deux rats DMD contrôles seront en outre injectés en intramusculaire avec les mêmes cellules hMustem et euthanasiés selon le même timing. En fonction des résultats de cette phase, la phase 3 de l'étude sera ou non lancée (Go/no go selon la présence ou non de cellules hMustem dans les muscles des animaux sacrifiés).

Phase 3 : Etude du potentiel de régénération musculaire à moyen et long terme chez des rats DMD injectés avec des cellules hMustem. 35 rats DMD maximum et 17 rats WT littermates maximum recevront un traitement immunosuppresseur (Tacrolimus/prednisolone) puis 4 injections IV de cellules hMustem (15 à 18 rats DMD + 15 à 17 rats WT) ou du véhicule uniquement (15 à 18 rats DMD « mocks ») à 1 semaine d'intervalle à chaque fois. Au sein de ces trois groupes, les rats seront sacrifiés de façon séquentielle (1,5, 4 ou 6 mois post-injection). Des analyses exhaustives seront réalisées pour évaluer l'efficacité du traitement au niveau histologique et phénotypique (suivi hebdomadaire du poids, actimétrie, évaluation de la force musculaire et de la fonction cardiaque).

Phase 4 : « Survie », afin de documenter l'impact des cellules hMuStem sur la survie des rats DMD : 20 rats DMD recevront le même traitement immunosuppresseur et le même protocole d'injection de cellules hMustem que lors de la phase 3. Les animaux seront ensuite suivis jusqu'à décès spontané ou jusqu'à ce que leur état général nécessite de prendre une décision d'euthanasie. Des analyses exhaustives seront également réalisées pour évaluer l'efficacité à long terme du traitement au niveau histologique et phénotypique.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer Le remplacement des animaux ne sera pas possible dans cette étude car il n'existe pas aujourd'hui de méthode alternative pour tester l'effet d'un traitement de thérapie cellulaire in vivo. L'animal est le seul organisme vivant permettant d'étudier l'impact de cette thérapie dans différents organes et sur le phénotype de l'animal malade.

Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est basé sur notre expérience précédente de protocoles de thérapie cellulaire lors desquels nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans être excessif en terme d'animaux à inclure. Une analyse statistique sera réalisée, en utilisant des tests non paramétriques de type Kruskal-Wallis à un facteur suivi de comparaisons multiples par paires.

Raffiner : Le bien-être animal passera par :

- de bonnes conditions d'hébergement selon réglementation avec enrichissement du milieu (tunnels en cartons ou PVC, frisottis de papier, bûchettes de bois et hébergement à deux animaux si possible).
- un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement),
- l'instauration de points limites pertinents avec mise en place de mesures adaptées (anesthésie, analgésie ou euthanasie),
- une réactivité accrue du personnel animalier avec mise en place d'une grille de scoring de la douleur dès que nécessaire pour détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates
- la mise en place de mesures adaptées en fonction des interventions (anesthésie et analgésie).

12692 Dans le cadre de la recherche de nouveaux médicaments permettant de lutter contre l'obésité, l'un de nos partenaires a identifié un gène impliqué dans la régulation des cellules stockant le gras.

Afin de mieux comprendre l'implication de celui-ci dans le métabolisme de la graisse, nous voulons analyser un modèle animal porteur d'une modification de ce gène afin de mettre en évidence d'éventuels déficits de régulation ou au contraire une amélioration de celle-ci.

Une lignée de souris génétiquement modifiée a été générée et nous allons exposer trois groupes d'animaux similaires à trois types de nourritures enrichies (la première diète contiendra plus de graisse, l'autre plus de sucres, la troisième sera intermédiaire) ou à une diète classique non enrichie. L'évolution du poids, mais aussi des mécanismes régulant le glucose sanguin ou la sensibilité à l'insuline seront ensuite testés tout au long du protocole.

Cela nous permettra de comprendre quelles sont les voies métaboliques affectées par l'absence de ce gène et ainsi mieux décrire son implication dans cette régulation des graisses. Pour cela, nous prévoyons d'employer un total de 64 animaux, afin de comparer les quatre régimes alimentaires en parallèle, en employant une série de procédures expérimentales.

Respect de la règle des 3R ;

REMPLETER : La régulation d'un équilibre aussi complexe que celui des graisses nécessite l'emploi d'un modèle animal. En effet, de nombreux organes sont impliqués et il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle alternatif offrant la possibilité d'analyser une telle complexité.

REDUCTION : Cet effectif constitue le nombre d'animaux le plus réduit dans le cadre des procédures expérimentales prévues. Nous avons une large expérience de ces procédures et de la variabilité inter-individuelle et nous avons pu déterminer qu'il s'agit de l'effectif optimal pour obtenir une donnée statistiquement interprétable tout en minimisant le nombre d'animaux employés.

RAFFINER : Durant chaque procédure expérimentale, mais aussi sur l'ensemble du protocole, les conditions d'hébergement des animaux seront optimales. Un accès illimité à la nourriture et à l'eau s'accompagne d'un enrichissement dans les cages et d'une surveillance quotidienne des animaux. Les animaux seront par ailleurs pesés chaque semaine et une évaluation des critères principaux de bien-être sera effectuée de manière concomitante. A l'aide d'une grille d'évaluation du bien-être, établie avec notre vétérinaire et la structure du bien-être animal, nous établirons le cas échéant des réponses appropriées à d'éventuels stress exprimés chez l'animal par une prostration, une perte de poids. Cette prise en charge pourra par exemple prendre la forme d'analgésiques locaux, de soins cutanés en cas de lésion.

Par ailleurs, durant les procédures expérimentales, nous utiliserons des analgésiques ou anesthésiques et des points limites et soins dédiés seront mis en place (ex : injection de glucose en cas d'hypoglycémie, réveil sur tapis chauffant après anesthésie).

12693 En élevage avicole, un des enjeux est d'empêcher l'apparition de coccidioses, maladies causées par un fort développement de parasites intestinaux, du genre *Eimeria*, qui prélèvent des nutriments et abîment la muqueuse intestinale. Ils entraînent ainsi retard de croissance, augmentation de l'indice de consommation, diarrhées, animaux affaiblis, prostrés, avec des brûlures aux pattes (expliquées par l'humidité de la litière liée aux diarrhées) et parfois de la mortalité. Le contrôle de ces populations de parasites est donc indispensable. Parmi les méthodes de contrôle employées, des additifs anticoccidiens mis dans l'alimentation des volailles sont très utilisés. Mais la réglementation en matière d'additifs autorisés dans l'alimentation animale est de plus en plus stricte, et limite l'incorporation de ces additifs utilisés en préventif.

Cette étude a pour finalité de distinguer les moyens de lutte les plus efficaces contre ces parasites. Notre étude évaluera l'efficacité de 4 stratégies de prévention anticoccidienne nouvelles ou classiques, chez 960 poulets de chair certifiés, soumis à une infestation parasitaire expérimentale. Les résultats seront comparés à ceux des 480 poulets de chair certifiés sans protection anticoccidienne (lots contrôles), exposés ou non aux parasites.

- le lot 1 comprendra 240 poulets qui ne recevront aucune stratégie anticoccidienne, et qui seront exposés aux parasites : ce sera un contrôle négatif
- le lot 2 comprendra 240 poulets qui ne recevront aucune stratégie anticoccidienne, et qui ne seront pas exposés aux parasites : ce sera un contrôle positif
- le lot 3 comprendra 240 poulets qui recevront un programme préventif classique avec alternance de deux additifs anticoccidiens (anticoccidiens 1 de 0-27j puis anticoccidiens 2 de 28 à 49j), et qui seront exposés aux parasites : stratégie anticoccidienne classique
- le lot 4 comprendra 240 poulets qui recevront un programme préventif classique « étendu » (anticoccidiens 1 de 0-19j puis anticoccidiens 2 de 20 à 49j), et qui seront exposés aux parasites : stratégie anticoccidienne classique
- le lot 5 comprendra 240 poulets qui recevront dans l'aliment (de 0 à 49j), un produit contenant des extraits de plantes et qui seront exposés aux parasites : stratégie anticoccidienne nouvelle
- le lot 6 comprendra 240 poulets qui recevront au couvoir (0j) un vaccin anticoccidien, et qui seront exposés aux parasites : stratégie anticoccidienne nouvelle

A 21j d'âge, chacun des animaux des lots 3 à 6, ainsi que ceux du lot 1, recevra 1ml contenant une dose connue de coccidies spécifiques du poulet à l'aide d'une seringue et une canule souple introduite par le bec. Cette inoculation va entraîner des signes cliniques tels que la frilosité et la diarrhée qui doivent durer 3-4 jours avec guérison spontanée.

Tous les poulets seront élevés, les critères sanitaires (morbidity, mortalité, lésions au niveau des pattes) et les performances (croissance, consommation d'aliment) seront suivis jusqu'à leur mise à mort pour évaluation des lésions intestinales (27j d'âge sur 24 poulets par lot) ou à l'abattoir (49j d'âge pour les poulets restant).

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Compte-tenu de l'objectif appliqué du projet en santé animale et zootechnie, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico valable.

Réduire : Le projet a pour objectif d'évaluer les effets zootechniques et sanitaires de stratégies de prévention anticoccidienne chez le poulet de chair soumis à une infestation coccidienne expérimentale. Des expériences précédentes ont montré que 6 répétitions de 240 poulets par lot sont nécessaires et suffisantes pour mettre en évidence des effets significatifs (5%) sur le poids des animaux et la consommation alimentaire ; 24 animaux par lot sont nécessaires et suffisants pour mettre en évidence des effets significatifs (5%) sur les lésions au niveau du tube digestif et tirer des conclusions.

Raffiner : les poulets seront élevés au sol sur des copeaux en conditions classiques à une densité inférieure au maximum autorisé (18 poulets/m²). Ils seront élevés par groupe de 40 et auront accès à l'aliment, l'eau de boisson ad libitum. Ils seront visités deux fois par jour afin de détecter précocement tout problème. Toute manifestation de symptômes comportementaux persistants définis par un point limite entrainera le retrait de l'animal de l'expérimentation, des critères d'arrêt seront appliqués. .

12694 Le développement de nouveaux outils thérapeutiques nécessite une bonne connaissance des signalisations impliquées dans la pathologie. Afin de décrypter les signalisations impliquées dans le développement des tumeurs osseuses et le remodelage des tissus calcifiés, le recours aux souris transgéniques invalidées pour certains gènes et/ou sur-exprimant d'autres gènes est nécessaire.

L'élevage de souris transgéniques de classe I (dossier de déclaration d'utilisation confinée d'organismes génétiquement déposé au MESR) sera réalisé dans une pièce dédiée de l'animalerie en portoirs ventilés afin de fournir le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation des protocoles de notre laboratoire ayant reçu un avis favorable du comité d'éthique. Un nombre de 20 souris mutants homozygotes sera nécessaire par année et par lignée pour des raisons de significativité des études statistiques des protocoles qui seront développés avec ces mutants. L'obtention de ces 20 mutants nécessite un nombre plus important d'animaux transgénique (hétérozygote) qui avoisinera les 100 souris /an en se basant sur la loi de Mendel, soit pour 10 lignées sur 5 ans un total de 5000 souris. Une analyse rétrospective des portées obtenues (nombre d'animaux hétérozygotes versus homozygotes...) sera faite tous les ans afin de voir si chaque lignée suit la loi de Mendel. Dans le cas contraire, une augmentation du nombre de croisement pourra être entrepris pour maintenir la lignée.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer les souris transgéniques sont l'unique outil pour l'analyse in vivo de la fonction (perte ou surexpression) d'u gène. Aucune technique alternative n'est actuellement disponible, le recours aux souris transgéniques est donc indispensable.

Réduire : Dans tous les cas, les animaux seront produits à la demande des expérimentateurs afin d'éviter toute euthanasie inutile d'animaux surnuméraires.

Raffiner : Pour le bien être des souris des frisottis en papier seront additionnés aux cages afin de permettre aux femelles gestantes de préparer les nids. Un enrichissement sous forme d'igloo en papier sera ajouté à chaque cage pour permette aux souris de s'isoler. Un régime adapté aux besoins sera utilisé lors de la gestation et la lactation (Type SDS RM3 ou équivalent). Le sevrage des petits sera effectué à quatre semaines sauf si présence d'un retard de croissance chez les petits mutants nécessitant un temps plus long auprès de la mère. Le marquage des souris se fera à l'oreille avec des bagues mises en place sous anesthésie gazeuse (Isoflurane 2-4% dans l'air) en même temps que le prélèvement (biopsie) du dernier millimètre de queue pour la caractérisation du génotype de chaque souris par PCR sur ADN génomique.

12695 L'ischémie-reperfusion rénale correspond à une baisse transitoire des apports sanguins aux reins, rencontrée dans de multiples situations cliniques (prélèvement de greffon rénal, chirurgie de cancer rénal, arrêt cardiaque...). Elle peut entrainer des lésions et une insuffisance rénale nécessitant le recours à la dialyse de façon transitoire voire définitive, et augmente la morbi-mortalité des patients. L'hypothermie est une méthode de protection d'organe dont la physiologie est encore mal comprise. Son effet bénéfique a été montré dans une seule étude clinique en transplantation rénale sans pour autant d'explication physiopathologique. Nous avons des données préliminaires montrant que l'hypothermie protégeait de manière significative des lésions d'ischémie reperfusion rénale chez des souris à 34°C plutôt qu'à 37°C. Cependant il n'existe que peu d'hypothèses sur les mécanismes de protection par le froid au niveau rénal. Nous faisons l'hypothèse que des protéines induites par le froid (CIRP et RBM3) auraient un rôle protecteur contre ces lésions et sur la fonction rénale, via notamment la diminution du stress oxydatif cellulaire médié par la mitochondrie. Nous proposons donc dans cette étude d'évaluer les voies par lesquelles l'hypothermie protège contre l'ischémie-reperfusion rénale, afin notamment de déterminer des cibles thérapeutiques applicables en situation

clinique. Le modèle sera un modèle d'ischémie transitoire par clampage bilatéral des pédicules vasculaires des reins chez la souris (occlusion des vaisseaux apportant nutriments et oxygène au tissu), en situation d'hypothermie à 34°C ou de normothermie à 37°C. La reperfusion (désocclusion des vaisseaux) surviendra après une ischémie de 20 minutes. Le protocole chirurgical est réalisé chez des souris C57BL6 sous anesthésie générale (et analgésie adaptée). Les animaux seront suivis tout au long de la chirurgie et en postopératoire. L'insuffisance rénale aiguë créée par l'ischémie entraîne des troubles ioniques susceptibles d'être mal tolérés par l'animal mais que l'on corrige par un traitement au bicarbonate de sodium. Trois protocoles seront réalisés avec trois durées de reperfusion différentes (2h, 24h et 1 mois) afin d'évaluer l'effet de l'ischémie reperfusion précocement et à distance sur l'apparition de lésions rénales chroniques. L'effet de l'hypothermie sera évalué à l'aide de marqueurs physiologiques (perfusion et fonction rénale) et biochimiques rénaux (analyse du tissu rénal et des marqueurs de mort cellulaire). Ce sont donc 3 groupes expérimentaux qui seront analysés pour un total de 76 animaux maximum pour ce projet.

Prise en compte de la règle des 3R :

Remplacer : L'étude des mécanismes impliqués ne peut être remplacée par des modèles cellulaires en raison des très nombreux types cellulaires composant le rein et de la complexité des voies de signalisation cellulaire modifiées par l'ischémie reperfusion rénale. Ainsi, ce projet ne peut être évalué que dans un modèle in vivo chez l'animal tant pour la compréhension précise de ces phénomènes que pour la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.

Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum nécessaire pour permettre une analyse statistique fiable des résultats

Raffiner : La chirurgie d'ischémie-reperfusion, parfaitement maîtrisée au laboratoire, est entièrement réalisée sous anesthésie. Les traitements anesthésique et analgésique ont par ailleurs été mis au point par des médecins anesthésistes réanimateurs dans le but de réduire au mieux la souffrance des animaux. Une surveillance quotidienne stricte, avec évaluation du réveil et de l'état de santé post-opératoire, permet de détecter rapidement toute complication éventuelle et d'adapter immédiatement la prise en charge, en respect des points limites préétablis, en particulier par un traitement analgésique adapté. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt pour éviter toute souffrance tout au long de la vie des animaux ;

12696 Le système immunitaire protège l'organisme, contre les infections ou l'apparition de tumeurs par exemple. Au sein de ce système, les lymphocytes T CD4, composés de multiples sous-populations, ont pour fonction d'orchestrer à la fois les réponses immunitaires anti-pathogènes et anti-tumorales et participent au maintien de la tolérance immunitaire en prévenant l'apparition de maladies auto-immunes et allergiques. Ce processus complexe est sous le contrôle de facteurs cellulaires environnementaux parmi lesquels en premier lieu, les Cellules Présentatrices d'antigènes (CPA) dérivées de la moelle osseuse qui lancent le processus immunitaire et la production de lymphocytes T. Le premier maillon de ce processus concerne donc la réponse des lymphocytes T à l'antigène présenté par les CPA. Toutefois, les sous-populations de Lymphocytes T circulent continuellement entre les organes lymphoïdes (thymus, ganglions...) et autres tissus. Au cours de leur voyage, leur survie, leur degré de différenciation et/ou leur fonction se modifient en fonction des signaux qu'elles reçoivent des cellules rencontrées. Ces signaux peuvent favoriser le processus anti-tumoral par exemple.

Il serait donc tentant d'utiliser de telles propriétés en thérapie anti-cancéreuse. Mais cette action ciblée peut se faire au détriment de la protection du « soi » avec pour conséquence le déséquilibre de l'homéostasie du système et le développement d'une maladie auto-immune, par exemple. Une meilleure connaissance du rôle de ces facteurs environnementaux pourrait permettre d'éviter ces dérives et déboucher sur leur utilisation en immunothérapie ciblée.

Ce projet a donc pour objectif principal d'identifier les acteurs cellulaires contrôlant le modelage du phénotype de sous-populations de Lymphocytes T par leur environnement en général et les CPA en particulier. La complexité de la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T in vivo ne

peut être reproduite par des méthodes alternatives in vitro ou ex vivo et nécessite l'utilisation d'animaux.

Le principe de ce projet consiste à isoler 5 sous populations de lymphocytes T de phénotypes connus provenant de souris sauvages et de les transférer à des souris receveuses dont le statut immunologique et/ou génétique a été modifié, permettant de fournir des environnements cellulaires différents.

La survie, le phénotype et la fonction de ces lymphocytes T seront analysés après plusieurs semaines de transplantation, dans les organes lymphoïdes secondaires et les tissus cibles prélevés en post mortem chez les souris receveuses.

Pour cela un modèle classique de chimères hématopoïétiques sera préalablement induit chez les souris receveuses : elles seront ou non irradiées pour détruire les lymphocytes et progéniteurs de leur moelle osseuse qui seront remplacés par greffe de cellules de moelle provenant de souris donneuses exprimant ou pas les molécules antigéniques des CPA ou de souris porteuses de mutations constitutives ou inductibles destinées à l'élimination de certaines populations cellulaires d'intérêt. Un deuxième volet, consistera à injecter des anticorps susceptibles de modifier l'environnement de souris receveuses porteuses d'un traceur fluorescent permettant de suivre le devenir des lymphocytes T régulateurs en fonction du temps.

Respect du principe des 3R :

Remplacer : L'utilisation d'animaux est justifiée par la complexité de la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD4 in vivo dans les ganglions lymphatiques des vertébrés qui ne peut être reproduite par des méthodes alternatives in vitro ou ex vivo.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum permettant une analyse statistique efficace des résultats. Des expériences préliminaires réalisées sur des nombres réduits d'animaux ont d'ores et déjà été ou seront mises en œuvre de façon à affiner les protocoles utilisés par la suite. Au total, ce projet nécessite l'étude de 1485 souris qui se déroulera sur 5 ans.

Raffiner : Les protocoles utilisés consistent essentiellement en des injections intraveineuses. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse des animaux, une surveillance quotidienne puis bihebdomadaire des animaux sera réalisée en respectant des points limites et des critères d'arrêt bien définis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Pour éviter toute souffrance, toutes les injections en intraveineuse se feront sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Les résultats obtenus devraient apporter une meilleure compréhension des mécanismes régulant la fonction des Lymphocytes T in vivo dont l'utilisation en immunothérapie se développe fortement.

12697 Objectif du projet :

La maladie d'Alzheimer (MA) est la première cause de démence dans le monde. Il est estimé que sa part de risque attribuable à des facteurs génétiques est comprise entre 60 et 80%. Caractériser ces facteurs génétiques est rapidement devenu un enjeu majeur afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la maladie. Des approches de biologie cellulaire, moléculaire et de modèles animaux ont permis de caractériser différents gènes candidats qui sous-tendent la MA.

L'objectif de ce projet est de confirmer le rôle de ces gènes dans le développement de la maladie. Pour cela, nous nous proposons d'étudier l'effet de l'injection intracérébrale, chez des souris de laboratoire, de ces gènes candidats par utilisation de vecteurs viraux (lentivirus).

Les modifications du réseau neuronal induites par l'injection des lentivirus contenant les gènes candidats seront ensuite analysées par la technique d'électrophysiologie ex-vivo (sur coupes cérébrales). Ces enregistrements seront effectués sur coupes cérébrales dans une région fortement impliquée dans l'apprentissage et la mémoire appelée hippocampe.

Ce projet, d'une durée de 5 ans nécessitera 505 souris.

Avantages :

Ce projet scientifique permettra d'appréhender le rôle de certains gènes impliqués dans la MA sur les modifications du réseau neuronal. L'électrophysiologie ex vivo est une technique très puissante

qui permet l'enregistrement de l'activité électrique à l'échelle d'un réseau de neurones ou de neurones isolés.

Dommmages escomptés :

Suite à l'injection virale stéréotaxique, les animaux peuvent présenter des signes de douleur malgré les précautions prises pendant la phase de chirurgie (analgésiques, anesthésiques) et en post-opératoire (antibiotiques). Dans ce cas, les points limites préalablement définis permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces pour soulager toute souffrance.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'étude du système nerveux, de par sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et ainsi aboutir au développement de nouvelles thérapies pour des pathologies neurodégénératives. Nos expérimentations seront réalisées chez la souris, rongeur de petite taille et d'élevage facile, qui possède un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

Réduire : Le nombre de souris utilisé a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Sur un même animal, nous pourrons enregistrer simultanément différents paramètres électrophysiologiques. L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

Raffiner : Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (jouets, copeaux de bois à ronger, contact visuel et olfactif entre les animaux, musique, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum.

Avant l'étape de chirurgie nécessaire aux injections virales, les animaux seront acclimatés pendant une période d'au moins 5 jours. Pendant l'étape de chirurgie, plusieurs mesures seront mises en place afin de réduire au maximum la douleur : utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques, application de gel ophtalmique afin d'éviter le dessèchement de la cornée, maintien d'une température constante par un tapis chauffant.

Des points limites et des critères d'arrêt préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée.

12698 La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) correspond à un groupe hétérogène de neuropathies périphériques chroniques héréditaires rares avec déficits moteurs et sensoriels. C'est l'un des troubles neurologiques dégénératifs les plus courants qui, tout en étant qualifié de rare, présente un taux de prévalence "élevé" (prévalence moyenne de 2,63 / 10 000 personnes). La CMT se caractérise par une diminution de la force musculaire et une fonte des muscles au niveau des extrémités, une déformation du pied, des douleurs musculo-squelettiques et neuropathiques, la perte de dextérité, la fatigue et la perte sensorielle. Certaines anomalies génétiques à l'origine de la CMT entraînent la démyélinisation des nerfs périphériques. A chacun des gènes mutés entraînant la démyélinisation, correspond un sous-type de CMT. Le sous-type CMT1A est de loin la forme la plus commune avec 40 à 50% des cas. Le défaut génétique à l'origine de la CMT1A est une duplication de 1.4Mb du chromosome 17p12-p11.2 contenant le gène PMP22 (peripheral myelin protein-22) codant pour une protéine constituante de la myéline des nerfs périphériques. La surexpression de PMP22 provoque un stress cellulaire aboutissant au dysfonctionnement des cellules de Schwann chargées de la production des protéines de la myéline, ayant pour

conséquence un dysfonctionnement des nerfs périphériques associé à des défauts de conduction de l'influx nerveux.

A l'heure actuelle aucun traitement n'est disponible pour le traitement de la maladie de Charcot-Marie-Tooth 1A.

Ce projet a pour but de maintenir et produire pour un client un modèle murin de la maladie de Charcot-Marie-Tooth 1A afin que ce dernier puisse travailler sur une solution thérapeutique contre la maladie.

Dans ce cadre notre client testera son candidat médicament sur un modèle animal de rat CMT1A ainsi que sur des cultures primaires dérivées de ces rats. Le maintien d'une colonie d'animaux et la production d'animaux est donc nécessaire.

Nous utiliserons dans ce projet la lignée CMT1A. Comme chez l'homme dans le cadre de la maladie de Charcot-Marie-Tooth type 1A, cette lignée de rat surexprime la protéine PMP22 ce qui entraîne une démyélinisation périphérique et une atrophie musculaire progressive. Cette lignée constitue donc un bon modèle pour étudier la maladie de Charcot-Marie-Tooth. Pour réaliser ce projet, et afin que notre client puisse tester son candidat médicament, nous croiserons des rats CMT1A hétérozygotes (He) avec des rats Wild type (Wt) ou sauvages. Les mâles He et Wt ainsi générés seront ensuite expédiés chez notre client. De plus et afin que notre client puisse effectuer ses études sur des cultures primaires dérivées d'embryons de rats, des accouplements programmés seront également réalisés afin de pouvoir générer et expédier des femelles gestantes qui seront envoyées entre 10 et 15 jours de gestation chez notre client.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Pour être valide, un modèle alternatif doit prendre en compte l'ensemble des phénomènes biochimiques et physiologiques qui ont lieu chez l'animal. A ce jour, aucun test in vitro (uni cellulaire) ou modèle informatique ne permet de rendre compte de l'ensemble de ces phénomènes, rendant nécessaire l'utilisation d'animaux modèles. Aucune méthode alternative n'est envisageable pour reproduire le plus fidèlement possible la pathologie qu'est la maladie de CMT,

Réduire : Pour pouvoir répondre aux besoins du client et livrer les lots requis pour ses études, nous estimons qu'un total de 2714 animaux sera utilisé dans ce projet (reproducteurs, animaux expédiés et animaux de non intérêt compris). Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé par notre client. Le nombre d'animaux par lots pour les études a été calculé par notre client de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats statistiquement significatifs. De plus et afin de répondre à ces besoins, nous avons favorisé le nombre et le schéma de croisement optimal permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux.

Raffiner : Les animaux seront placés dans des conditions optimales de température avec un cycle jour/nuit de 12h/12h et seront maintenus dans un environnement enrichi (bâtons de bois, matériel de nidification) et hébergés en groupes sociaux. Ils auront accès sans restriction à l'eau et à la nourriture et seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt pour éviter toute souffrance aux animaux..

12699 L'épilepsie touche près de 1% de la population et se caractérise par des crises répétitives. A l'heure actuelle, cette pathologie représente un réel problème de santé publique puisque, malgré l'existence de nombreux médicaments antiépileptiques, environ 30% des épilepsies sont résistantes aux traitements pharmacologiques, on parle alors de pharmaco-résistance. Le but de nos études est de comprendre les mécanismes responsables de différents types d'épilepsies. Une conséquence dramatique observée chez certains patients épileptiques et dans des modèles de souris est une mort spontanée qui apparaît sans signes et sans autre cause médicale, phénomène appelé SUDEP (Sudden Unexpected Death in Epilepsy). Les mécanismes à l'origine de la SUDEP sont inconnus, les deux principales origines suspectées étant un arrêt ventilatoire et/ou un arrêt cardiaque.

Les canaux ioniques sont des protéines impliquées dans la genèse de plusieurs types d'épilepsies. Nous nous intéressons aux conséquences fonctionnelles des mutations d'un canal ionique sodique sur l'activité des cellules musculaires cardiaques ou cardiomyocytes. Dans un modèle de souris invalidées pour ce canal dans tous les organes, dont le cerveau et le cœur, nous avons démontré que les cardiomyocytes de jeunes souris sont hyperactifs et que plusieurs protéines impliquées dans la régulation du calcium sont dérégulées. Néanmoins, nous ne savons pas si les anomalies observées sont dues à l'absence du canal dans le cerveau et/ou à l'absence du canal dans le cœur. Notre projet est d'étudier la régulation du calcium sur des cardiomyocytes fraîchement isolés à partir de souris invalidées pour le canal uniquement au niveau cardiaque. Ce projet permettra de vérifier si l'absence du canal au niveau du cerveau est nécessaire, par un effet via le système nerveux autonome par exemple, ou non, pour expliquer les modifications cardiaques que nous avons observées. Cela permettra d'améliorer nos connaissances des mécanismes à l'origine des SUDEP afin de développer de nouveaux traitements pharmacologiques. Pour obtenir l'absence du canal uniquement au niveau cardiaque nous devons injecter une molécule qui déclenche l'invalidation du canal. Avant injection les souris sont normales et ne présentent aucun symptôme. D'après un article publié, les souris invalidées au niveau cardiaque uniquement ne présentent que des altérations du rythme cardiaque mais ne font pas de SUDEP (phénotype non dommageable). Le risque est l'obtention d'une fibrose cardiaque pour des doses trop importantes injectées, nous allons donc dans un premier temps mettre au point le protocole d'injection.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Nous ne pouvons pas remplacer par un modèle de lignée cellulaire car nous devons être dans les mêmes conditions que le début de l'étude. De plus, les effets du système nerveux autonome étant possibles, l'ensemble du projet ne pouvait pas être réalisé sur des lignées cellulaires.

Réduire : Nous testerons dans l'ordre les protocoles d'injection les moins stressants pour les animaux en premier et arrêterons la phase de test dès obtention d'une invalidation de 50 % (maximum 74 souris utilisées si les 8 protocoles prévus sont utilisés). Après obtention du protocole optimale nous l'utiliserons puis les souris seront euthanasiées afin de préparer des cardiomyocytes en culture (1 souris par culture). Environ 30 cultures réussies sont nécessaires donc nous utiliserons au maximum 40 souris pour cette procédure en anticipant les éventuels problèmes pouvant survenir. Le nombre total d'animaux utilisé est donc au maximum de 114

Raffiner : Chaque animal ne subira au maximum que 5 injections intrapéritonéales. Les animaux sont hébergés dans des cages enrichies (buchette en bois et abris), surveillés régulièrement et en cas de signes de souffrance constatés, un ensemble de mesures de Raffiner est prévu (surveillance, pesée, analgésie, désinfection, ...) grâce à la définition préalable de points limites précoces et de critères d'arrêt pour éviter toute souffrance.

12700 Les antibiotiques sont utilisés en élevage pour soigner les animaux malades. Leur utilisation peut engendrer des bactéries qui sont résistantes aux antibiotiques. Ces antibiotiques deviennent donc inefficaces, que ce soit pour soigner les animaux ou pour soigner les humains. Pour limiter ce risque, il est donc très important de développer des solutions alternatives, permettant de se passer ou de réduire fortement l'utilisation d'antibiotiques en élevage.

Une solution est de sélectionner les animaux plus résistants aux maladies. Le principe est de choisir comme reproducteurs les animaux présentant une meilleure santé et dont leur famille est en bonne santé. Ces animaux sont utilisés comme reproducteurs, et ensuite, parmi leur descendance, on choisira à nouveau les animaux en meilleure santé qui seront accouplés entre eux pour produire la génération suivante. Des méthodes statistiques permettent de faire les meilleurs choix de reproducteurs. Au fur et à mesure des générations, on obtiendra des animaux plus résistants aux maladies. Après 3 générations de sélection, les animaux « résistants » (ceux sélectionnés) seront comparés à des animaux « sensibles » (non sélectionnés) pour montrer l'efficacité de la sélection. Des calculs statistiques montrent qu'après 3 générations la différence entre animaux sensibles et

résistants sera suffisamment grande pour pouvoir être détectée. Nous regarderons les différences de réponse immunitaire et les différences au niveau des gènes entre ces deux groupes d'animaux. Pour effectuer cette démonstration, nous utiliserons le lapin, à la fois comme espèce modèle pour d'autres animaux d'élevage, et comme espèce cible, parce que le lapin est l'une des espèces les plus exposées à l'utilisation d'antibiotiques en France. Les lapins seront élevés dans des conditions similaires à celles des élevages français, mais sans antibiotiques.

Le projet se décompose en trois parties :

Essai A : sélection d'animaux résistants. A partir d'une population d'origine supposée « sensible aux maladies » nous sélectionnerons des animaux de plus en plus résistants à chaque génération pendant 3 générations. L'état de santé sera observé sur chaque jeune lapin à 63 jours pour choisir comme reproducteurs ceux en meilleure santé. Les effectifs totaux pour cet essai seront de 501 reproducteurs et 9000 jeunes lapins âgés de 63 jours (600 lapins par cycle de reproduction x 5 cycles de reproduction par génération x 3 générations).

Essai B : Constitution d'un troupeau sensible. Des embryons issus de la population d'origine « sensible » seront implantés sur 40 femelles porteuses pour engendrer 84 reproducteurs sensibles qui seront les parents du groupe de lapins « sensibles » de l'essai C.

Essai C : Comparaison des animaux résistants et sensibles. Le but de cet essai est la mise en évidence d'une différence de résistance entre les lapins résistants et les lapins sensibles, par comparaison à 800 lapins résistants (issus de parents de l'essai A) et 800 lapins sensibles (issus de parents de l'essai B). Nous réaliserons une prise de sang unique sur chaque lapin de cet essai pour étudier la réponse immunitaire générale des animaux (comptages des différents types de globules blancs)

Pour l'ensemble du projet, nous avons un nombre de lapin estimé de 11 225 lapins (9000 jeunes lapins et 501 reproducteurs de l'essai A, 40 lapines porteuses et 84 reproducteurs de l'essai B, 1600 lapins de l'essai C). Pour comprendre les effets de la sélection sur les gènes, deux biopsies d'oreilles seront prélevées sur chaque animal reproducteur des essais A et B et sur l'ensemble des lapins de l'essai C (soit 2185 lapins prélevés). Après expérimentation, les 40 lapines porteuses seront euthanasiées. Tous les autres lapins intégreront le circuit de production classique et seront envoyés à l'abattoir pour commercialisation.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Ces travaux sont destinés à l'amélioration de l'élevage de lapin et visent à démontrer qu'il est possible d'améliorer la résistance aux maladies des animaux par sélection génétique. Il n'est pas possible d'utiliser des simulations ou des approches in-vitro.

Réduire : La taille des troupeaux a été calculée pour observer une différence significative de résistance entre les lapins résistants et les lapins sensibles lors de l'essai C, pour limiter la consanguinité lors de l'essai A, et garantir une bonne variabilité et bonne représentativité de la population d'origine pour l'essai B.

Raffiner : Les prises de sang et prélèvements de biopsies d'oreilles seront pratiquées par du personnel formé et disposant des autorisations nécessaires à l'expérimentation animale. Lors de la chirurgie pour l'implantation d'embryons, toutes les lapines seront anesthésiées, et tous les moyens seront mis en œuvre afin de limiter au maximum le stress et la douleur de l'animal au cours de cette procédure (manipulation par les animaliers habituellement en charge des animaux, traitement de la douleur postopératoire). Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt pour éviter toute souffrance.

12701 Les recherches développées dans ce projet ont pour but d'étudier les mécanismes d'adaptation à un stress nutritionnel chez les mammifères. Au cours de la dernière décennie, nous avons démontré, dans des cellules en culture, le rôle clé joué par la voie eIF2 α /ATF4 dans le processus d'adaptation à une carence en acides aminés. Par la suite, nous avons validé la fonctionnalité de cette voie chez la souris en réponse à la consommation d'un repas carencé en un acide aminé indispensable. Afin de pouvoir étudier le rôle joué par cette voie de signalisation au niveau de l'animal entier, nous

avons entrepris de générer une lignée de souris transgénique qui exprime le gène rapporteur luciférase sous le contrôle de séquences de fixation (AARE) et du facteur de transcription ATF4.

Pour chaque année, un stock de 100 souris transgéniques homozygotes fonctionnelles (mâles ou femelles) sera constitué à partir d'environ 150 souris ce qui correspond à 500 souris sur 5 ans. Les souris transgéniques non fonctionnelles pour l'induction du transgène seront euthanasiées. Les souris sélectionnées serviront à (1) la reproduction et (2) à des expériences nutritionnelles.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Ces expériences nutritionnelles vont permettre de valider des résultats déjà obtenus in vitro et sont nécessaires pour évaluer l'impact des différents régimes testés sur l'organisme entier

Réduire : Des groupes "contrôle" adaptés au protocole seront constitués. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience est calculé au minimum en fonction du test statistique retenu

Raffiner : Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur vie, grâce à des points limites précoces (perte de poids, consommation...) et des critères d'arrêt.préalablement définis pour éviter toute souffrance.

12702 Les fonctions du système nerveux central sont principalement expliquées par le rôle prépondérant que jouent les neurones. Ainsi les états de vigilances sont dus aux changements de l'activité neuronale. Bien que de nombreuses avancées dans le domaine aient été réalisées, la nécessité des changements d'activité neuronale qui se produisent lors des différentes phases du sommeil reste peu comprise. Il ressort pourtant que le besoin vital de dormir met en jeu des mécanismes permettant au système de se « réinitialiser ». Il est probable qu'outre les neurones, les cellules de soutien des neurones, les cellules gliales, participent à la remise à zéro du système. La contribution des cellules gliales est pourtant peu étudiée. Le but de ce projet est de déterminer le rôle des cellules gliales dans les différents états de vigilance. Nous étudierons ces cellules sur un modèle de souris transgénique. Les mouvements des prolongements de certaines cellules gliales seront étudiés par microscopie sur des animaux vigiles habitués à la contention. L'étude des mouvements des cellules gliales nous permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui se produisent durant les phases de sommeil et ainsi de mieux comprendre la nécessité du sommeil dans les mécanismes de mémorisation. Ce type d'étude se faisait jusqu'à présent essentiellement sur des modèles primate non-humains. Avec cette approche, nous voulons tirer parti des avantages qu'apporte la souris (les modèles génétiques) pour améliorer notre compréhension des mécanismes de mémorisations mis en jeu durant les cycles veille/sommeil et des interactions cellulaires qui les sous-tendent. Les résultats obtenus dans cette étude permettront d'identifier de nouvelles cibles cellulaires et moléculaires impliquées dans les pathologies du sommeil et de la mémoire.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R.

Remplacer : Notre projet de recherche fondamentale avec une application directe à la pathologie (troubles du sommeil et de la mémoire) ne peut être réalisé sur l'homme et ne peut être modélisé du fait du manque de données biologiques, nécessitant le recours à l'animal.

Réduire. Le nombre d'animaux utilisés sera restreint avec un maximum de 55 souris.

Raffiner : Nous veillerons à limiter le mal être des animaux en raffinant notre procédé de contention et en réalisant des habituations de nos souris à la manipulation Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur vie, grâce à des points limites précoces et des critères d'arrêt.préalablement définis pour éviter toute souffrance.

12703 *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie responsable d'infection pulmonaire grave chez les patients atteints de mucoviscidose et chez les patients en réanimation. Cette bactérie, au gré de successives antibiothérapies, devient résistante à tous les antibiotiques habituellement utilisés. Aussi il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques aux antibiotiques comme les probiotiques. Les probiotiques, parmi lesquels certaines souches de *Lactobacillus*, sont des microorganismes qui, administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte.

Lors d'une précédente étude, 1 mélange de 3 souches de lactobacilles issus de patients atteints de mucoviscidose nommé Lactobacilli psb « Lpsb » (L. paracasei, L. salivarius, L. brevis) a été administré par voie intranasale de manière préventive dans un modèle murin d'infection pulmonaire à P. aeruginosa. Nous avons démontré que ce traitement préventif respiratoire à base de Lactobacilli diminuait de façon significative la quantité bactérienne pulmonaire à P. aeruginosa 24h après l'infection, par rapport au groupe de souris n'ayant pas reçu les Lactobacillus.

Par la suite, chacune des 3 souches a été administrée indépendamment des 2 autres par voie intranasale dans le même modèle murin. Nous avons démontré que le traitement préventif respiratoire à base de L. salivarius et de L. brevis diminuait la quantité bactérienne pulmonaire à P. aeruginosa 24h post-infection par rapport au groupe de souris n'ayant pas reçu de lactobacille et celles ayant reçu L. paracasei. Nous avons ensuite mis en évidence que le mélange des deux bactéries (L. salivarius + L. brevis) possédait un meilleur effet que celui observé avec chacune des deux souches testées individuellement.

Désormais, au vu de ces résultats prometteurs, les investigations nécessitent d'être poursuivies afin de déterminer si le mode d'administration (nasal ou oral) de ces Lactobacillus importe quant à leurs capacités à lutter contre ce pathogène au niveau pulmonaire. Nous utiliserons la souche L. rhamnosus GG (LGG) comme contrôle puisqu'il s'agit de la souche de Lactobacillus très souvent utilisée chez l'Homme et l'animal, dont les effets sont très bien décrits dans la littérature.

Nous utiliserons 56 souris, afin de mener à bien ces expérimentations.

Nous analyserons la quantité de P. aeruginosa dans le poumon 24 heures après l'instillation du pathogène.

Des dosages de molécules immunitaires pulmonaires et sanguins seront réalisés 24 heures après l'infection à P. aeruginosa. Des analyses du microbiote pulmonaire et digestif de ces souris seront également menées afin de définir les mécanismes d'action de ces Lactobacillus.

L'ensemble de ce projet respecte les principes de la règle des 3R :

Remplacer : Les Lactobacillus ont été sélectionnés in vitro dans un premier temps. Pour la suite, nous souhaitons identifier le mécanisme d'administration au meilleur potentiel et comprendre les mécanismes d'action des bactéries bénéfiques via les modifications des microbiote pulmonaires et digestif. Nous ne pouvons répondre à cette question en utilisant des outils de culture cellulaire et tissulaire (culture in vitro et ex vivo), nous avons besoin de la complexité d'un organisme entier.

Réduire : Le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet

Raffiner : Les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (anesthésie préalable des animaux avant toutes procédures expérimentales ainsi que l'utilisation de lampes chauffantes) Des points limites précoces sont définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12704 Dans le cadre de la réalisation de prestations de techniques de cryoconservation et de reproduction assistée sur rongeurs de laboratoire au sein de notre laboratoire et pour les besoins de la communauté scientifique, nous avons recours dès que possible à un traitement de superovulation des femelles à collecter afin d'accroître leur rendement ovulaire.

Ainsi et conformément à la règle des 3R, un traitement de superovulation permet d'obtenir un nombre accru d'ovocytes ou d'embryons par femelle et donc de réduire le nombre d'individus à utiliser.

Deux hormones sont utilisées pour l'établissement de cette superovulation :

- la PMSG est utilisée pour mimer l'effet de maturation des ovocytes des follicules endogènes (FSH)
- la hCG est utilisée pour mimer l'ovulation induite par la LH.

Depuis les dernières décennies, la superovulation est utilisée avec succès pour la génération de modèles génétiquement modifiées comme pour la réalisation de techniques de reproduction pour

la communauté scientifique. Au sein de notre structure nous privilégions ce traitement afin de réduire le nombre d'animaux à collecter.

Grâce à l'administration de gonadotrophines, il est possible d'induire chez les femelles traitées, une ovulation avec un nombre d'ovocytes supérieur à la normale et à un moment prévisible. Ceci entraîne donc une diminution du nombre de femelles nécessaire pour la collecte d'une quantité définie d'embryons pour laquelle nous n'aurions pas eu recours à ce type de traitement.

La technique de superovulation décrite ci-dessous est celle couramment utilisée pour assurer les prestations de cryoconservation de modèles ou dans l'application de techniques de Raffiner d'élevage intégrant des transferts d'embryons visant à assainir une colonie respirante ou l'accroître plus rapidement.

La réponse à l'injection de gonadotrophine varie d'une souche à l'autre au sein même d'une même espèce de rongeurs. La dose optimale et l'âge des femelles sont préalablement définis pour chaque souche en effectuant des injections préliminaires dose-réponse et par expérience. En règle générale, des doses de 5 à 10 unités internationales (UI) par souris de chaque gonadotrophine et âgées de 21 à 35 jours (poids corporel de 12 à 14 grammes) donneront le meilleur rendement en œufs fécondés. Chez le rat, les doses varient entre 20 et 50 UI par individu femelle et de préférence prépubère.

Les femelles reçoivent une injection intra-péritonéale (IP) de sérum de jument gestante (PMSG) le jour 1.

Le 3ème jour (48 à 52 heures après l'injection de PMSG), elles reçoivent une injection IP de gonadotrophine chorionique humaine (HCG).

Si la fertilisation à lieu IN VIVO, immédiatement après l'injection de hCG, la femelle est accouplée avec un mâle fertile pour une nuit. Le lendemain un contrôle de la présence ou de l'absence de bouchon vaginal, témoignant d'un coït est réalisé.

Si la fertilisation à lieu IN VITRO, les femelles sont prélevées après avoir été mise à mort au CO₂ ou par dislocation cervicale selon les protocoles autorisés par la directive 2010/63/UE et les ovocytes mis en contact de sperme fécondant dans un milieu et des conditions atmosphériques optimales pour la fécondation.

Nous réaliserons ce traitement sur un nombre maximum de 8700 rongeurs pour une période de 5 années

La règle des 3R est appliquée.

Remplacer : Sachant que la nature même du projet vise à obtenir un meilleur rendement ovulaire de l'espèce choisie pour réduire et raffiner, le remplacement d'individu de cette dernière n'est pas envisageable.

Réduire : Nous réalisons la prestation à la demande de nos clients. Le nombre d'animaux dépend du besoin de ces derniers.

Raffiner : Les animaux seront maintenus dans des cages contenant de l'enrichissement, dans des conditions optimales de température avec cycle jour/nuit de 12h/12h et avec accès à volonté à l'eau et à la nourriture. Ils seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié afin de s'assurer de leur bon état général : comportement, aspect du pelage, perte de poids, mobilité ou tous autres troubles seront vérifiés afin de s'assurer du bien-être des animaux. En cas de changement de comportement ou d'aspect, une surveillance augmentée sera mise en place. Des critères d'arrêt seront appliqués.

12705 Contexte scientifique : la barrière hématoencéphalique (BHE) assure la protection du cerveau en contrôlant les échanges entre le sang et le cerveau. Des ruptures de cette barrière peuvent entraîner des effets néfastes sur les neurones (neuro-inflammation, mort neuronale, ...).

D'autre part dans certaines pathologies comme les encéphalites virales (Herpes, VIH), il est nécessaire de faire entrer dans le cerveau des molécules thérapeutiques antivirales. Nos travaux

préliminaires montrent qu'il est très difficile d'ouvrir cette BHE en utilisant des agents pharmacologiques, elle pourrait être modifiée par des changements gravitaires.

Le but de nos expériences est d'étudier les mécanismes qui sous-tendent l'ouverture de la BHE lors d'une exposition à des changements de gravité. Sur terre, il est possible de modifier la gravité en l'augmentation par centrifugation de l'habitat du sujet d'expérience. Les protocoles expérimentaux consistent donc à étudier comment les animaux s'adaptent à des transitions répétées entre des niveaux de gravité de 1G à 5G maximum. Objectifs de l'étude : par l'injection de traceur fluorescent de masse moléculaire connue il sera possible de déterminer la taille maximum des molécules capables de passer la BHE lors d'un changement gravitaire. D'autre part, des molécules plasmatiques peuvent passer cette barrière en cas de rupture de celle-ci (immunoglobuline, fibrinogène, ...).

Nous étudierons le passage de molécules exogènes dont la taille avoisine soit celle de molécules d'intérêt thérapeutique soit de molécules connues pour entraîner de la neurodégénérescence.

La présente demande concerne un total de 384 souris. Les animaux sont répartis en lots contrôles versus centrifugés et pour chaque lot il y aura 4 injections différentes (3 molécules de masses différentes et du sérum physiologique) par campagne de centrifugation, il y aura 2 campagnes de centrifugation par an pour les 3 ans du projet. La mise en place de ce protocole respecte les objectifs des 3R :

Remplacer : Les expériences proposées visent à identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de l'ouverture de la BHE en contexte hypergravitaire. L'ouverture de la BHE ne peut être étudiée que sur un modèle in vivo car elle implique des mécanismes complexes de régulation neurovasculaire non reproductible in vitro à ce jour.

Réduire : Les résultats seront évalués statistiquement une fois les 2/3 de l'étude réalisés afin de voir si les résultats obtenus permettent de ne pas réaliser le dernier 1/3.

Raffiner : Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Les animaux sont surveillance vidéo permanente dans le dispositif de modification gravitaire afin de pouvoir intervenir si un point limite est observé. Par ailleurs, ils sont hébergés en groupes dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition en permanence. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt pour éviter toute souffrance.

12706 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de produit permettant de réparer le cartilage. Les produits proposés aux patients atteints de lésions de cartilage sont des palliatifs (paracétamol, injection de corticoïdes ou d'acide hyaluronique) et pour les cas les plus avancés, la pose de prothèses orthopédiques. Depuis quelques décennies, des produits issus de la thérapie cellulaire émergent mais les résultats restent encore non satisfaisants.

Le produit testé dans le cadre de cette étude a pour objectif de réparer le cartilage et permettre aux patients de ne plus souffrir et retrouver leur mobilité.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation relative aux Médicaments de Thérapie Innovante (MTI) décrite dans le règlement européen CE n°1394/2007 de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché et pour la réparation cartilagineuse, la chèvre est le modèle animal le plus approprié.

Ce projet de recherche appliquée, d'une durée de 9 mois, prévoit un nombre maximum de 12 chèvres. La procédure, de classe de sévérité sévère, vise à étudier en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) la réparation du cartilage, au niveau du genou, après implantation d'un produit d'ingénierie tissulaire.

Effets néfastes attendus sur les animaux : l'implantation du produit à tester nécessite la création de défauts (réalisés par un foret) au niveau ostéo-cartilagineux du genou d'une patte postérieure.

Après la dernière session d'imagerie, l'animal sera euthanasié afin de prélever les sites d'implantation pour analyses histopathologiques.

Règle des 3R :

Remplacer : Nous sommes fortement engagés dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Réduire : Le nombre de chèvres utilisées dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (norme ISO 10993 – partie 6 : méthodes d'évaluation de la sécurité des dispositifs médicaux) et sur les contraintes scientifiques (bien-être animal et étude de l'évolution de la réparation). Le même animal sera suivi en IRM à 2, 5 et 9 mois après implantation, ce dernier point correspondant à la fin de l'étude.

Raffiner : Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt. Par ailleurs, les chèvres seront hébergées en groupes sociaux, le plus souvent en extérieur, hors période post-opératoire

Dans tous les cas, l'hébergement individuel est validé par la SBEA et une dérogation aux conditions d'hébergement est renseignée dans la DAP.

12707 Contexte : La greffe d'organes est un acte médical de la dernière chance. Elle est envisagée quand l'état du malade se dégrade et que seul le remplacement du ou des organes défaillants par un organe sain peut permettre son amélioration. En 2017, en France, plus de 57 000 personnes vivent avec une greffe et 27 000 autres sont dans l'attente d'une transplantation.

Le sérum anti-lymphocytaire (SAL - ATG) est un médicament immunosuppresseur constitué d'immunoglobulines anti-lymphocytaires (anticorps poly-clonaux) qui, chez le patient transplanté, réduit de façon temporaire la quantité de lymphocytes T afin de prévenir le rejet de greffe.

La fabrication de produits biologiques tel que le SAL est soumise à de nombreux contrôles et un niveau d'Assurance Qualité élevés.

Dans la mesure où le SAL est produit sur lapin et qu'il n'existe pas de méthode in vitro permettant l'obtention d'anticorps poly-clonaux de qualité équivalente, la production de 600 ml du sérum de contrôle nécessite 6 lapins. Ce volume permet d'avoir un fonctionnement de routine pendant à minima 4 ans sous réserve de la stabilité/intégrité du réactif.

Règle des 3R :

Remplacer : il n'existe pas de méthode in vitro permettant l'obtention d'anticorps poly-clonaux de qualité équivalente

Réduire : Afin de minimiser le nombre d'animaux impliqués, trois prélèvements dont un terminal sont programmés, à un intervalle de 48h. Le projet implique un maximum de 12 lapins sur 5 ans.

Raffiner : Les mécanismes physiologiques compensatoires se mettent en place au-delà d'un prélèvement de 20% de la volémie, ce qui impose un temps de récupération de deux semaines. Aussi pour limiter leur impact, les deux premiers prélèvements se limitent à 30 ml soit 12% du volume sanguin circulant. La mesure de l'hématocrite permet d'évaluer l'état d'anémie chez le lapin. Ce paramètre, inclus dans les points limite, permet de suivre l'état des animaux. En cas de signes cliniques ayant des répercussions sur le bien-être animal, des mesures rapides et appropriées seront prises pour minimiser la contrainte expérimentale.

12708 Le cheval est un herbivore monogastrique dont le système digestif est adapté à digérer de petites quantités d'aliments très fibreux tout au long de la journée. Cependant, les besoins en nutriments des chevaux athlètes ne peuvent être couverts uniquement par des fourrages, d'autant plus conservés. Il y a donc nécessité de distribuer en plus des fourrages des aliments riches en énergie, souvent composés de céréales, riches en amidon. Or, des études ont corrélé quantité d'amidon ingérée et développement d'ulcères gastriques chez les chevaux.

L'étude présente vise donc à démontrer l'intérêt de la distribution d'un aliment pauvre en amidon et riche en matières grasses et fibres dans la prévention des ulcères gastriques. Sera ainsi étudié l'effet de la quantité d'amidon ingérée par repas sur la santé gastrique :

- via un suivi par gastroscopie à raison de 5 par cheval sur l'ensemble du protocole,
- via un suivi par prises de sang à raison de 10 par cheval sur l'ensemble du protocole comprenant un suivi sur 8h de plusieurs marqueurs sanguins l'avant-dernier jour du protocole. Ces prises de sang nous permettront de corréler d'éventuels marqueurs sanguins aux scores d'ulcères gastriques mesurés par gastroscopie. Ceci afin de définir des marqueurs sanguins de la santé gastrique dont le suivi serait moins invasif que la gastroscopie.

Cette étude permettra de démontrer l'intérêt de l'utilisation de l'aliment Adult Specific Energy dans la prévention des ulcères gastriques, et donc de mettre en place des conseils pour les propriétaires et détenteurs d'équidés.

Règle des 3R :

Remplacer : Notre projet est développé dans l'objectif de donner des conseils pratiques aux détenteurs d'équidés, il doit donc être développé sur des équidés, dans des conditions de vie classiques de vie de ces animaux, afin de pouvoir répondre aux questionnements scientifiques posés.

Réduire : Le nombre d'individus défini pour chaque groupe (5) correspond au minimum permettant une analyse des données via des méthodes statistiques.

Raffiner La santé globale des animaux sera suivie durant tout le protocole en réalisant des pesées hebdomadaires. Les actes pratiqués dans le cadre de cette étude sont peu invasifs et peu douloureux. Ils seront pratiqués par des vétérinaires formés aux bonnes pratiques d'exercice de la médecine vétérinaire. Les gastroscopies seront réalisées sous sédation / analgésie.

Les chevaux seront hébergés dans des conditions normales de chevaux au travail :

- box en litière paille, mise à disposition d'eau propre, d'une pierre de sel pur et de foin à volonté.
- mise au paddock en herbe (avec foin, sel et eau propre à disposition) 4 à 6h par jour.

12709 Les rayonnements ionisants (RI) impactent directement la santé des organismes vivants. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de faibles doses de RI sur la reproduction d'un animal vertébré, le poisson. En effet, les RI sont connus pour impacter significativement la reproduction en condition chronique d'exposition, conduisant potentiellement à perturber la structure et le fonctionnement des écosystèmes. Il est donc nécessaire de connaître cet impact pour améliorer l'évaluation du risque écologique. Si un nombre restreint mais croissant de données montre que les RI affectent les

capacités de reproduction (fécondité, succès reproducteur, survie des larves), les mécanismes d'action toxique ne sont pas encore entièrement élucidés. De plus, les données d'effets disponibles sont issues de conditions d'irradiation qui concernent le plus souvent un seul stade de vie, en particulier le stade adulte. Il est donc nécessaire d'acquérir de nouvelles données obtenues l'ensemble des stades de vie (embryon, juvénile, adulte).

Compte tenu de son mode de reproduction, le poisson zèbre *Danio rerio* fait partie des modèles biologiques d'intérêt majeur pour l'acquisition de données sur cette fonction biologique

En première approche, ce protocole utilisera 31190 poissons zèbre adultes, sur 5 ans, pour l'étude de 2 débits de doses en condition chronique d'irradiation multigénérationnelle (+ un contrôle non exposé). A l'issue de la reproduction des adultes irradiés, une partie de la descendance sera irradiée selon les mêmes conditions expérimentales. Une seconde partie de la descendance sera quant à elle, placée en conditions contrôles (non exposées, Recovery) afin d'évaluer les effets transmis à la descendance.

Règle des 3R :

Remplacer : A ce jour, les outils *in vitro* disponibles ne permettent pas une telle évaluation.

Réduire : La mutualisation des animaux utilisés par ce projet permettra d'enrichir d'autres domaines de recherche menés dans le service. Ils permettront l'étude de la neurotoxicité (cerveau) et de l'immunotoxicité (rate) permettant de dresser un bilan des effets de l'irradiation gamma en conditions d'irradiation chronique. Enfin, le nombre d'animaux retenus satisfait les exigences statistiques pour permettre l'obtention de résultats exploitables et publiables. Ce projet concerne l'étude de la reprotoxicité. Or, l'embryogénèse, la gamétogénèse et la reproduction nécessitent des conditions d'exposition réduisant au maximum le stress. Le respect du bien-être animal est indispensable au succès de ces expérimentations.

Raffiner : Les débits de dose retenus sont faibles ; le premier est inférieur à la valeur maximale rencontrée à Tchernobyl, le second est proche de la valeur générique de protection des écosystèmes. Ainsi, ces expérimentations ne devraient pas entraîner de souffrance animale. Les *Danio rerio* seront hébergés en groupe dans des portoirs spécifiques qui permettent le suivi des paramètres d'ambiance (température, conductivité, pH). De plus, des observations quotidiennes seront réalisées pour assurer le bien-être des animaux.

12710 Les plaquettes sanguines ont pour principale fonction d'assurer l'arrêt d'un saignement en cas de blessure vasculaire. Leur nombre est régulé de 2 manières, d'une part par leur production au niveau de la moelle osseuse mais également par leur élimination au niveau du foie ou de la rate. La durée de vie des plaquettes est d'environ 7-10 jours chez l'homme. Chez une personne saine, on dénombre habituellement entre 150 et 450 milliards de plaquettes par litre de sang. Lorsque ce taux est inférieur au seuil de 150 milliards/litre, on parle de thrombopénie, souvent associée à un risque de saignements plus important. À l'inverse, des taux trop élevés entraînent une thrombocytose, ce qui augmente les risques de thrombose, c'est-à-dire de formation d'un caillot dans la circulation sanguine qui altère, voire stoppe, le flux sanguin dans certains vaisseaux. De nombreuses situations cliniques sont associées à une diminution du nombre de plaquettes, comme par exemple après chimiothérapie qui altère la production des plaquettes. Dans certains cas, la cause de la thrombopénie est inconnue. C'est le cas par exemple des patients souffrant d'une insuffisance respiratoire ou cardiaque et qui sont placés sous assistance circulatoire mécanique. Les pompes présentes dans ces systèmes d'assistance circulatoire entraînent des modifications des conditions de circulation du sang qui sont susceptibles de modifier l'aspect des plaquettes, conduisant à leur élimination.

Les objectifs de ce travail sont d'une part d'évaluer la durée de vie des plaquettes après passage de ces dernières dans un système *in vitro* d'assistance circulatoire par rapport à des plaquettes contrôles et si cette durée de vie est modulée et d'autre part d'évaluer l'impact de la perte de récepteurs membranaires observée à la surface des plaquettes après passage *in vitro* dans ces pompes. Pour cela nous injecterons les plaquettes humaines chez des souris immunodéficientes afin de mesurer leur durée de vie dans la circulation. Un total de 216 animaux sera utilisé.

Le respect de la règle des 3R a été une préoccupation constante dans la préparation du protocole de notre étude.

Remplacer : L'élimination des plaquettes par un organisme implique plusieurs organes (foie, rate) et ne peut donc pas être modélisée *in vitro*, ce qui justifie notre utilisation de modèles animaux.

Réduire : L'expérience serait conduite en utilisant 216 souris, ce qui représente le plus petit nombre de souris permettant d'atteindre les objectifs de ce projet et d'avoir une réponse statiquement analysable.

Raffiner : L'expérience sera réalisée sur la période la plus courte possible (24 heures) et ne comportera qu'une seule injection intraveineuse et des prélèvements sanguins sous anesthésie du plus petit volume de sang possible. Tout sera mis en œuvre pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux utilisés. Nous adapterons la procédure en tenant compte des points limites à ne pas dépasser, en particulier un comportement indicateur d'une souffrance quelconque. Par ailleurs, tout au long des procédures, les animaux seront suivis par des personnes habilitées et expérimentées pour travailler avec les animaux.

12711 Notre vie quotidienne est une chaîne complexe et discontinue de décisions et d'actions qui définissent nos comportements. Face à une situation de choix, chaque individu tendra à sélectionner la meilleure action possible parmi l'ensemble des alternatives possibles. Ce processus de « prise de décision » intervient sur la base d'une évaluation subjective propre à chaque individu des coûts et bénéfices de chaque action. Le cortex préfrontal a émergé comme un acteur potentiel de ce processus. Cependant, de nombreuses structures sous-corticales agissent avec le cortex préfrontal à fin d'encoder et de traiter tout changement dans la valeur subjective de ces conséquences. De façon intéressante, le cortex préfrontal dorsale (dPFC) est massivement innervé par des projections issues du noyau basolatéral de l'amygdale (BLA) Cette structure est par ailleurs essentielle aux tâches comportementales de prise de décision que nous nous proposons d'étudier. Les mécanismes synaptiques et neuronaux en jeu entre la BLA et le cortex préfrontal restent cependant peu connus à ce jour. Notre projet tirera partie des méthodes *in vivo* les plus modernes afin d'étudier de façon spécifique les connexions synaptiques entre la BLA et le cortex préfrontal, et donc de déterminer les relations causales entre le traitement de l'information dans le cortex préfrontal et les comportements de prise de décision.

Règle des 3R :

Remplacer : L'étude des mécanismes de la prise de décision est un enjeu sociétal et économique majeur des neurosciences modernes, comme le relèvent de nombreuses situations humaines inadaptées (prise de risque, addiction au jeu, compulsivité ...). Par définition, ces mécanismes ne peuvent être étudiés que chez des animaux vigiles confrontés à une situation de choix. Dès lors, aucun des modèles *in vitro* ne peut être utilisé ici.

Réduire : Au total, 300 souris seront utilisées dans notre projet. La solidité de nos hypothèses de travail (vérifiée par des expériences pilotes), la nature innovante des méthodes utilisées (imagerie biphotonique chronique), ainsi que la qualité de la mise en œuvre des procédures (basée sur une expertise reconnue de l'expérimentateur) permettra de réduire significativement le nombre des animaux.

Raffiner : Les chirurgies se feront sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès le réveil de l'animal et qui sera maintenue tant que l'animal montre des signes de souffrance. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

12712 Selon l'OMS pas moins de 15 millions de décès sont dus au cancer dans le monde chaque année soit presque 1 décès toutes les 2 secondes. Bien qu'il y ait eu de grands progrès dans la mise au point de médicaments contre le cancer, la recherche pour la mise au point de médicaments plus

performants permettant de prolonger la durée de vie des patients atteints de cancer reste plus que jamais une urgence. L'objectif de notre projet est d'évaluer l'activité anti-tumorale de produits pharmacologiques chez la souris.

Les molécules pharmacologiques étudiés auront été sélectionnés pour leurs propriétés anti-tumorales vis-à-vis des tumeurs dans des tests cellulaires adaptés.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer : Dans un premier temps, les différentes molécules candidates sont testées in vitro sur les cellules cancéreuses. Cette étape permet d'éliminer les composés inactifs pour inhiber la prolifération des cellules cancéreuses. Ensuite les molécules actives in vitro vont subir une série de tests in vitro pour mettre en évidence leur absence de toxicité. Ainsi seules les molécules montrant une efficacité et une innocuité in vitro seront évaluées in vivo. On ne peut pour l'instant pas remplacer cette étape étant donné qu'il est impossible de restituer actuellement la complexité du vivant dans les modèles in vitro.

Réduire : En accord avec les publications scientifiques et selon des contraintes statistiques nous réalisons notre étude avec des groupes de 8 souris. Il est prévu d'évaluer l'activité de 10 candidats médicaments par an à 3 doses. En incluant dans l'étude un groupe contrôle traité par le solvant seul. Ainsi qu'un groupe contrôle positif (médicament de référence approuvé dans l'indication étudiée). Selon le schéma suivant :

- 8 souris contrôle (solvant)
- 8 souris composé à dose faible
- 8 souris composé à dose intermédiaire
- 8 souris composé à dose forte
- 8 souris composé de référence (contrôle positif)

Par conséquent 400 souris par an est nécessaire. Ce qui correspond à 2000 souris pour une période de 5 ans.

Raffiner : Seuls les molécules présentant le meilleur rapport efficacité/innocuité in vitro seront étudiées in vivo. Avant de démarrer le protocole in vivo nous faisons une série de vérifications pour s'assurer que le produit administré présente le profil réglementaire (choix de solvant, pH) pour être administré à l'animal par voie orale. De plus, seuls les composés, biodisponible, vont faire l'objet d'une étude d'efficacité.

Nous faisons également une étude préalable, pour déterminer les doses administrées ne présentant aucun effet indésirable pour l'animal pendant l'étude.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier d'état général des animaux. Et une mesure du poids de l'animal une fois par semaine. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12713 Un des défis majeurs rencontré dans la maladie de Parkinson est son diagnostic tardif, car basé sur l'apparition de symptômes moteurs bien postérieurs à l'initiation de la maladie. A ce stade, des lésions irréversibles telles qu'une perte de 40-60% des cellules dopaminergiques de la substance noire et le développement d'inclusions protéiques pathologiques sont déjà présentes. Connaître les processus pathologiques précoces de la maladie de Parkinson qui précèdent les étapes dégénératives est impératif pour développer des bio-marqueurs précoces et envisager des solutions thérapeutiques à un stade où la prévention et les traitements sont plus susceptibles d'être efficaces. Aujourd'hui, nous manquons de modèles animaux récapitulant les symptômes précoces de la maladie.

L'objectif du projet est de développer un modèle murin des stades précoces de la maladie de Parkinson. En utilisant ce modèle, nous identifierons les (1) mécanismes pathologiques précoces et (2) bio-marqueurs potentiels des stades précoces de la pathologie, puis testerons des (3) approches thérapeutiques visant à réduire la progression de la maladie avant l'apparition des symptômes moteurs.

Au delà des 5-10% de cas héréditaires, la maladie de Parkinson est principalement idiopathique. L'interaction entre susceptibilité génétique et l'exposition à des facteurs environnementaux présentent une possible étiologie de la maladie. Les pesticides sont connus comme facteurs de risques environnementaux de la maladie de Parkinson conduisant le gouvernement français à reconnaître comme professionnelle cette maladie pour les agriculteurs. Des études épidémiologiques humaines ont également montré que le polymorphisme commun du gène BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), augmente le risque de développer la pathologie en association avec une exposition aux pesticides. Dans le but de mimer une voie possible de développement de la maladie chez l'homme, nous allons utiliser une voie naturelle d'exposition aux pesticides, la voie nasale. Cette voie d'exposition permet aussi de tester l'hypothèse de Braak suggérant que le bulbe olfactif serait une des premières structures affectées par les inclusions protéiques de la maladie de Parkinson, et ceci bien avant l'altération de la substance noire et l'apparition de symptômes moteurs.

Nos objectifs sont doubles. D'une part, modéliser les stades précoces idiopathiques de la maladie de Parkinson par une exposition intra-nasale chronique de pesticides chez des souris knock-in exprimant le polymorphisme Val66Met du gène BDNF. Puis, utiliser ce modèle pour identifier et manipuler les mécanismes moléculaires altérés lors des stades précoces afin de limiter la progression de la pathologie.

Notre projet se déroule donc en 4 principales expériences permettant 1) d'optimiser le modèle, 2) de valider le modèle 3) d'identifier les mécanismes et biomarqueurs impliqués dans les stades précoces de la pathologie et 4) de tester des approches thérapeutiques.

Règle des 3R :

Remplacer : Dans la mesure où nous souhaitons modéliser une maladie neurodégénérative en déterminant la progression des symptômes les plus précoces au plus tardifs tels que des déficits d'olfaction et des symptômes moteurs nous avons besoin des modèles animaux. Nous avons opté pour un modèle murin, le plus petit des mammifères dont l'organisation cérébrale est relativement comparable à celle de l'homme et qui après manipulation génétique, nous donne accès à l'étude de polymorphisme génétique humain.

Réduire : Ces expériences sont conçues pour réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires. En effet, nous optons au maximum pour des études longitudinales nous permettant de suivre la progression de la pathologie sur le même lot d'animaux. Enfin l'optimisation des différentes procédures expérimentales utilisées nous permet d'améliorer le confort des animaux et de réduire le nombre d'animaux nécessaire en diminuant la variabilité. L'ensemble de ces expériences nécessitera l'utilisation d'environ 816 souris sur 5 ans.

Raffiner : Avant chaque test comportemental, les souris seront habituées aux procédures expérimentales afin de réduire leur stress due à la nouveauté, la variabilité des résultats et augmentera leur bien-être. Une grille de score pour évaluer les signes de souffrance spécifiques de la souris, sera utilisé pour surveiller les animaux, définissant des points limites et des critères d'arrêt précis.

A l'issue de ce projet, nous aurons produit un modèle murin des stades précoces idiopathiques de la maladie de Parkinson en combinant risques génétiques et environnementaux. Ce modèle sera essentiel à l'avancement de notre compréhension des phases précoces de la maladie de Parkinson.

12714 La malnutrition désigne un état pathologique causé par la carence (sous-nutrition) ou l'excès d'un ou de plusieurs nutriments (sur-nutrition). Actuellement, la sous-nutrition est considérée comme un problème de santé majeur dans les pays à faible revenu. Elle peut être provoquée par un apport alimentaire insuffisant, un déséquilibre de la balance nutritive, ou à une altération de la digestion et une mal absorption des nutriments. En effet, la sous-nutrition chronique, notamment chez les enfants, affecte leur santé et leur développement (retard de croissance juvénile sévère). La sous-nutrition n'est pas simplement provoquée par une carence alimentaire mais est souvent associée à un changement significatif dans la composition du microbiote intestinal (dysbiose) et de sa fonctionnalité. Les essais cliniques ont montré, qu'une intervention nutritionnelle thérapeutique

seule est insuffisante pour restaurer un microbiote intestinal sain et améliorer l'état de santé des enfants sous-nourris.

Certaines souches de bactérie de type lactobacille ont un rôle bénéfique sur la promotion de la croissance chez les souris mises sous régime carencé en protéines. Elles favoriseraient de plus, l'amélioration des capacités digestives de la souris. De ce fait, nos résultats suggèrent fortement que ces micro-organismes pourraient être utilisés comme un probiotique pour traiter la malnutrition et les pathologies qui y sont associées notamment le retard de la croissance chez les enfants.

Ces observations légitiment la réalisation d'une étude scientifique qui devrait permettre de mieux comprendre :

- 1) les relations entre la sous-nutrition et le retard de croissance,
- 2) d'évaluer les effets bénéfiques de souches de lactobacilles sur la fonction digestive de souris élevées en régime carencé en protéines.

Nous pensons que notre étude va identifier un rôle important de l'utilisation de souches de lactobacilles sélectionnées qui, combinée à l'utilisation d'un probiotique le N-acetylglucosamine, va permettre d'améliorer l'état de santé de l'hôte (ex : restauration du retard de croissance juvénile) dans des conditions de malnutrition chronique qui est un modèle peu traumatisant pour l'animal et qui mime les conditions de sous-nutrition observées chez l'enfant.

Nous prévoyons l'utilisation d'un maximum de 300 souris sur une période de 5 ans tout en respectant les règles des 3R :

Remplacer : L'utilisation d'animaux est essentielle parce que interactions entre microbiote et hôte ne peuvent pas être étudiées in vitro.

Réduire : Le nombre d'animaux est à minima dans notre étude et tout en respectant leur bien-être et en soulageant leur douleur si elle est provoquée. Ce nombre de souris nous permettra de tester l'effet bénéfique du probiotique Lactobacillus sur la digestion pour lutter contre le développement du retard de croissance provoqué par le régime de sous-nutrition

Raffiner : Les animaux seront manipulés sans stress par des personnes compétentes en expérimentation animale. Les conditions d'hébergement et de soins utilisées et des points limites adaptés associés à des procédures de surveillance des animaux seront appliquées dans le respect du bien-être animal, ceci afin de limiter au maximum la souffrance subie par l'animal.

12715 L'objectif de notre société est de proposer à façon la synthèse d'anticorps monoclonaux dirigés contre différents types de cibles, protéines, peptides, acides aminés et leurs métabolites, sucres, acides gras, etc.

La synthèse d'anticorps rentre dans un cadre de prestation de service que nous proposerons à nos clients. Ces anticorps permettront de détecter et/ou quantifier une cible sur un élément biologique grâce à l'utilisation de méthode d'immunodétection et d'ELISA respectivement. D'autre part, les anticorps représentent des outils thérapeutiques en pleine croissance ; notamment en immunoncologie.

A ces fins, une seule concentration d'immunogène sera injectée, afin de limiter le nombre d'animaux. Les groupes sont de 10 animaux pour obtenir des réponses immunitaires permettant d'aboutir au moins à 1 ou 2 animaux producteurs d'anticorps, évitant ainsi de répéter une étude.

A la fin de l'immunisation, après l'euthanasie des animaux et le prélèvement de la rate, une lignée cellulaire productrice d'anticorps est générée. Celle-ci est amplifiée, congelée et conservée et permet d'avoir une source infinie d'anticorps.

Ces expériences seront réalisées dans les meilleures conditions éthiques en respectant la règle des 3Rs et conformément à la législation en vigueur.

Remplacer et Réduire dans le cas des anticorps monoclonaux, représentent une réalité, car avec une souris positive, nous créerons une lignée cellulaire et travaillons ensuite in vitro pour la production des anticorps. 20 études par an utilisant 10 animaux sont envisagées, ce qui représente un total de 1000 animaux pour une durée de 5 ans.

Raffiner : Les animaux des études sont hébergés dans des conditions veillant au respect de leur bien-être (en fratrie) et avec un milieu enrichi (jouet) afin de limiter leur stress. Ils sont hébergés dans des cages, sur des litières de copeaux de peupliers. Les animaux sont suivis quotidiennement afin de détecter tout inconfort ou souffrance. Une étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et notre équipe d'expérimentateurs permet d'intervenir immédiatement sur les animaux en cas de nécessité.

12716 Contexte de la recherche : Les implants utilisés habituellement dans la reconstruction cranio-maxillo-faciale sont des matériaux de biocompatibilité limitée. Leurs propriétés physiques et mécaniques, notamment en cancérologie ORL et maxillo-faciale, diminuent fortement le taux de succès de ces interventions chirurgicales. Ils sont rigides et entraînent dans de nombreux cas des fractures de la plaque ou un rejet. Bénéfices attendus : Les objectifs sont la fabrication de nouveaux implants d'ostéosynthèse inspirés de l'industrie automobile pour l'utilisation dans des applications biomédicales.

Nous utiliserons 2 procédés de fabrication différents (chimique et physique) qui seront comparés à une méthode de référence (plaque en titane classique).

Espèces et nombres attendus : 34 rats au total seront implantés et répartis en 3 groupes selon la zone d'implantation et le procédé d'assemblage du biomatériau.

Domages attendus : La procédure chirurgicale d'implantation produira des risques de différents types :

- hémorragique per et post-opératoire, infectieux, douleur,
- anesthésique

Des difficultés à la mobilisation peuvent apparaître en post-opératoire et entraîner une réduction des prises alimentaires ainsi qu'une altération de l'état général.

Cette étude est une première étape avant de pouvoir utiliser ce nouveau type de biomatériaux plus souple, biocompatible et mieux adapté à la prise en charge de la reconstruction crânienne et maxillofaciale des cancers, traumatismes et malformations de l'extrémité céphalique. En cas de succès, il pourra être utilisé chez l'homme lors d'essais cliniques.

Application de la règle des 3R :

Remplacer : Les tests in vitro ont été faits. Le test de compatibilité et d'intégration de ce nouveau biomatériau ne peut être fait que sur l'animal avant une utilisation chez l'homme avec des enjeux en matière de cancérologie et de santé publique.

Réduire : le nombre minimal d'animaux utilisé a été défini par des tests statistiques. Le modèle animal d'implantologie crânienne et fémorale est décrit dans la littérature. Raffiner : L'ensemble des règles garantissant le bien-être des animaux seront respectées. La surveillance sera assurée par d'une grille de score clinique :

- Apparence : Inactif, moins actif/Ataxique/Pelage hirsute/Regard morne/Animaux blottis/Isolé/Grimace faciale/Paupières mi-closes/Écoulement oculaire, nasal/Absence de toilettage/Démangeaisons/ Respiration anormale (inspiration/min)/ Type de respiration (par ex. rapide, superficielle, laborieuse, normale)/ Crottes dures, molles/ Ne s'alimente pas/ Ne boit pas/ Dos voûté/ Contraction abdominale/ Démarche sur la pointe des pieds

- Manipulation : Agressif/ N'est pas curieux, alerte/ Croûtes au niveau des yeux, nez/ Réticent à se déplacer/ Déshydratation / Couleur de la peau/Vocalisations/ Hyperactif / Poids corporel/ Différence de poids depuis le début de l'étude : en % / Différence de poids différent depuis la veille : en % /Température corporelle /Traitement/ Croissance dentaire démesurée.

Les points limites seront définis et respectés avec arrêt de l'expérience s'il y a une perte de plus de 20% de poids malgré des mesures adaptées (désinfection de la plaie/Analgésie), Exposition du biomatériau ou défaut de cicatrisation >50%. Écoulement des yeux, léthargie, dos courbé, ataxie, tremblement. Difficulté à la marche

Les rats seront manipulés plusieurs fois avant de débiter les expérimentations dans un souci d'habituation. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale. Un traitement

contre la douleur sera mis en place dès la chirurgie d'implantation puis sera poursuivie en postopératoire. Les rats seront hébergés à 2 par cage, leurs cages seront enrichies par des dispositifs permettant l'usure de leurs dents type bâtonnets de bois ou plastiques, l'établissement de cachette en papier ou tissus, des tubes.

12717 L'alcool constitue la deuxième cause de mortalité évitable après le tabac. Il s'agit de la substance psychoactive (ie. une substance ayant une action cérébrale) la plus consommée en France en population générale. La toxicité est double et concerne les effets d'une prise chronique, mais également ceux d'une prise massive aiguë.

Sur le plan pharmacologique, l'alcool va agir sur de nombreux messagers chimiques cérébraux et notamment sur le GABA et le glutamate. Le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur et le glutamate un neurotransmetteur excitateur. Lors d'une prise aiguë d'alcool, il est décrit une potentialisation de la réponse GABAergique et une diminution de la transmission glutamatergique. Or, le maintien de l'équilibre entre ces deux neurotransmetteurs est essentiel aux processus de mémorisation. Cependant, bien que les effets délétères de la consommation chronique d'alcool soient documentés, les effets lors d'une prise aiguë sont encore mal connus.

D'autres molécules pharmacologiques pourraient également perturber cet équilibre GABA/glutamate. C'est le cas des benzodiazépines. Les benzodiazépines sont des traitements anxiolytiques largement utilisés dans le traitement de l'anxiété et des troubles du sommeil. Ils agissent également sur le GABA. Les effets délétères de la prescription de benzodiazépines à court terme sur la mémoire et la cognition sont bien établis, mais les répercussions à long terme d'une prise aiguë sont peu connues.

Or, les situations cliniques de prise simultanée de plusieurs substances psychoactives, telles que l'alcool et les benzodiazépines sont fréquentes, par exemple lors de crises d'angoisses, ou de tentatives de suicide. Cependant, on connaît mal les effets potentiels sur la mémoire de telles conduites.

L'objectif de ce travail est donc d'évaluer les conséquences d'une prise aiguë de substances psychoactives qui agissent sur le GABA (l'alcool et les benzodiazépines) de manière isolée et conjointe.

Pour cela, nous étudierons tout d'abord l'impact de ces intoxications sur les messagers chimiques cérébraux par l'intermédiaire de la spectroscopie par résonance magnétique (SRM), avant et juste après intoxication, puis 3 semaines après l'intoxication. La SRM est une technique d'imagerie non invasive permettant de quantifier les messagers chimiques cérébraux dans une région d'intérêt. L'impact fonctionnel sera ensuite évalué par des tests comportementaux 3 semaines après intoxication, réalisés juste avant la dernière analyse par l'imagerie. Enfin, l'impact physiopathologique sur les structures cérébrales sera évalué par une analyse histologique post-mortem.

La recherche clinique dans le domaine des addictions à l'alcool et aux anxiolytiques étant limitée par des contraintes à la fois matérielles et éthiques, le développement de modèles animaux en SRM et en comportement permettra d'aider à déterminer les mécanismes sous-jacents afin d'identifier à terme des cibles thérapeutiques.

Application de la règle des 3R :

Remplacer : La réalisation de SRM in vivo permet de limiter l'utilisation d'animaux puisqu'elle permet une quantification en temps réel à différents temps, à la place d'un dosage postmortem qui demanderait plus d'animaux

Réduire : De la même façon, les animaux utilisés pour le suivi longitudinal comportemental seront également utilisés pour l'étude histologique post-mortem. Ainsi, 260 rats de souche Wistar (130 mâles et 130 femelles) seront utilisés au total pour les différentes manipulations.

Raffiner : Par ailleurs, un suivi quotidien des animaux sera effectué pour surveiller l'apparition éventuelle de souffrance ou de points limites pour lesquels des décisions adaptées de traitement analgésiques voir d'euthanasie seront prises.

12718 La Tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle. Elle apporte des informations capitales pour la compréhension de l'activité neurochimique du cerveau chez l'homme, d'une manière non traumatique.

Les molécules psychoactives telles que la nicotine, le cannabis ou l'alcool sont des substances largement utilisées, agissant principalement sur le système nerveux central dont elles altèrent le fonctionnement. La co-intoxication avec plusieurs molécules psychoactives comporte d'autant plus de dangers que les mécanismes d'action de certaines interactions sont méconnus. Il a été montré, par exemple, que l'alcool potentialise l'effet de l'ecstasy. De même, l'association caféine/nicotine a un effet particulièrement stimulant car l'activation des récepteurs nicotiniques par la nicotine s'ajoute à l'inhibition des récepteurs de l'adénosine par la caféine.

Le but de ce projet est d'étudier en TEP, chez le modèle rongeur, d'une part, l'effet de l'intoxication aiguë ou chronique par des molécules psychoactives comme l'alcool, le tabac et le cannabis sur le fonctionnement et l'intégrité cérébrale, et d'autre part, les conséquences de la co-administration de ces molécules (nicotine/caféine, ecstasy /alcool) sur leur mode d'action et la potentialisation de leurs effets. L'effet neuro-inflammatoire de ces drogues sera aussi étudié. Des radiotraceurs permettant d'étudier l'activité et le fonctionnement de différents systèmes de neurotransmission cérébrale seront utilisés chez l'animal à l'état normal (contrôle) et après intoxication aiguë par une molécule psychoactive. Bien que la co-administration avec plusieurs molécules psychoactives est dangereuse, elle reste fréquente d'où l'intérêt de mieux comprendre les mécanismes de ces interactions au niveau cérébrale en imagerie.

Application de la règle des 3R :

Remplacer : La majorité des molécules psychoactives induisent des modifications de plusieurs systèmes de neurotransmission, modifications difficilement reproductibles in vitro sur des cellules. Il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal.

Réduire : Le nombre d'animaux pour cette étude (260 rats), provenant d'un fournisseur agréé, a été déterminé grâce à des données de la littérature scientifique, et à des études précédemment réalisées sur l'effet de certains médicaments in vivo. Ceci nous a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés mais néanmoins suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Raffiner : Le choix de rongeurs est basé notamment sur le fait que leur fonctionnement cérébral est bien étudié et leurs différents systèmes de neurotransmissions cible des molécules psychoactives sont bien caractérisés. Leur volume cérébral est compatible avec la résolution actuelle des tomographes.

L'état de santé des animaux sera étroitement surveillé tout au long des expériences et évalué cliniquement afin de limiter leurs contraintes. Les examens sont effectués sous anesthésie générale avec tapis chauffant permettant de thermoréguler l'animal. Nous réalisons une anesthésie locale pour certaines manipulations susceptibles d'induire une souffrance afin de maintenir le bien être de l'animal. Des points limites précoces sont définis avec une mise en place de critères d'arrêt. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu des rats est également enrichi à l'aide de kleenex et de maison en plastique.

12719 De nos jours, contrairement aux nouveautés dans la lutte contre le surpoids et l'obésité très peu de produits sont développés dans le but d'augmenter la prise alimentaire et le poids des personnes. Pourtant, de nombreuses personnes nécessitent une augmentation de la prise alimentaire comme les personnes âgées et cachexiques dues aux traitements anti-cancéreux. En effet dans chacune de ces perturbations physiologiques la prise est alimentaire est diminuée et une restauration de cette dernière améliorerait considérablement la condition de vie de ces personnes.

Le 1er janvier 2013, selon une étude de l'INSEE la France comptait 65,8 millions d'habitants. La population française continuait de vieillir sous l'effet de l'allongement de la durée de la vie et de l'avancée en âge des générations du baby-boom. Les habitants âgés d'au moins 65 ans

représentaient 17,5 % de la population. De plus la proportion de personnes âgées est en constante augmentation. L'une des conséquences liées au vieillissement est une diminution de la prise alimentaire. Cette diminution est souvent associée à une perte de poids chez les personnes âgées et est responsable de nombreuses perturbations physiologiques (ostéoporose, défaillance viscérale, affaiblissement général ...).

- la cachexie est un affaiblissement profond de l'organisme (perte de poids, fatigue, atrophie musculaire, etc.) lié à une dénutrition très importante. La cachexie n'est pas une maladie en elle-même, mais le symptôme d'une autre comme pour l'anorexie mentale. Dans le cas de la cachexie liée aux cancers, les traitements subis par les patients ou les cancers par eux-mêmes sont responsables de leur état de dénutrition.

Les causes moléculaires et biochimiques qui conduisent à ces différents états de dénutrition sont hautement complexes et pas encore complètement élucidées, voire comprises. Des dérégulations de l'axe intestin-cerveau et donc du comportement alimentaire et d'autre part du maintien de la masse corporelle pourraient être à l'origine de ces états. En effet, les données récentes suggèrent que l'axe intestin-cerveau est fortement impliqué dans la régulation du comportement alimentaire par les signaux nerveux et hormonaux provenant du tube digestif. Il semblerait que le microbiote intestinal participe fortement à cette régulation. En effet, ce microbiote serait capable de produire des protéines ayant des homologues de séquences avec les protéines impliquées dans la régulation de la prise alimentaire. Ainsi, en administrant par voie orale des micro-organismes produisant une ou des protéines ayant des similitudes avec la ghréline, la seule hormone orexigène connue à ce jour, pourrait permettre de restaurer la prise alimentaire voire le poids corporel. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer les capacités de souches de micro-organismes produisant des protéines mimétiques de la ghréline à moduler positivement la prise alimentaire et/ou le poids sur différents modèles animaux.

Nos études *in silico* montrent que de nombreux micro-organismes présentes des protéines ayant un mimétisme de séquence de 5 acides aminés avec la ghréline qui est impliquée dans la régulation de la prise alimentaire. Afin de respecter les règles éthiques et de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés au cours de ces études, seulement 11 d'entre elles (commensales) ayant déjà un statut probiotique ont été choisies afin d'être testées pour développer de nombreux produits probiotiques dans la lutte contre la perte de poids et la dénutrition.

La liste de souches envisagées est la suivante :

- différentes espèces de *Lactobacillus* (*fermentum*, *brevis*, *acidophilus*, *plantarum*, *gasseri*, *ingluvei*)
- les souches *Enterococcus faecium* et *faecalis*
- la souche *Bifidobacterium adolescentis*
- la souche *Aspergillus oryzae*
- la souche *Saccharomyces cerevisiae*

Application de la règle des 3R :

Remplacer : Ce projet permettra l'étude de l'influence des produits testés sur le microbiote intestinal et ses conséquences sur le comportement alimentaire dans le but de proposer des nouvelles stratégies thérapeutiques, le recours à des modèles animaux est donc nécessaires pour prendre en compte cet aspect multi-organes.

Réduire : Afin de réduire le nombre d'animaux âgés utilisés et d'animaux subissant le modèle de cachexie cancéreuse, les différentes souches seront dans un premier temps testées à trois doses (1×10^8 , 1×10^9 et 1×10^{10} deux fois par jour dans 0,2mL) sur des modèles de souris soumis à différentes diètes (standard, high fat et no sucrose)

Nombre de souris pour la première étape : 11 souches sur 3 diètes, 4 groupes par souche (trois doses + CT), 15 animaux par groupe soit $11 \times 3 \times 4 \times 15 = 1980$ souris

Dans la seconde étape de ce projet, seules les trois meilleures souches (gain de poids, prise alimentaire, augmentation de la composition corporelle) à la dose la plus efficace seront testées sur un modèle de rats âgés (rats de 18 mois) qui présente souvent une diminution de la prise alimentaire et sur un modèle de cachexie cancéreuse lié à un traitement le méthotrexate (MTX) qui induit une

forte diminution de la prise alimentaire et du poids dans les premiers jours de traitements. Sur ces deux modèles, 1 groupe contrôle sera utilisé et ces expériences seront effectuées en diète standard. Ainsi, sur 2 modèles, 4 groupes par modèle (trois souches à la dose efficace et CT), 14 animaux par groupe soit $2 \times 4 \times 14 = 112$ rats

En effectuant ce cheminement d'expériences et en utilisant plus de souris sur la première étape de screening cela permet de diminuer considérablement le nombre de rats subissant le modèle MTX (32 rats).

Raffiner Sur ce modèle ainsi que dans les autres le bien-être des animaux sera évalué chaque jour. De plus le modèle MTX étant un modèle de classe de douleur sévère en cas de mal-être des animaux de la buprénorphine à la dose de 0.1 mg/kg sera administré. Si la douleur persiste plus de deux jours, les animaux seront euthanasiés.

12720 Cette demande d'autorisation à expérimenter concerne un projet de recherche fondamental d'ordre générique, à savoir l'étude des neuropathies auditives. Dans ce projet, il s'agit de décrire un protocole expérimental général qui s'appliquera à différentes lignées de souris transgéniques sélectionnées en fonction de leur utilité pour comprendre la physiopathologie des neuropathies auditives et faciliter le développement d'outils thérapeutiques

Les neuropathies auditives sont des surdités qui se traduisent par une absence ou une désynchronisation des potentiels auditifs évoqués, c'est-à-dire une altération du transfert du message nerveux le long de la voie auditive jusqu'au cerveau. Il existe différents types de neuropathies auditives chez l'homme. Elles ont pour origine une atteinte des cellules sensorielles, les ciliées internes, de la cochlée (organe sensoriel de l'audition) ou du nerf auditif. Les mécanismes de ces pathologies sont mal connus. Pour élucider les mécanismes à l'origine de ces pathologies, nous utiliserons plusieurs lignées de souris transgéniques reproduisant différentes formes de neuropathies auditives humaines. L'étude expérimentale chez ces animaux consistera à explorer l'évolution de la fonction auditive chez des souris de différentes lignées, âgées de 1, 3 et 6 mois, et de la comparer à celle de souris témoins du même âge, ne développant pas de pathologie auditive.

Les tests auditifs consisteront à évoquer et mesurer les activités électriques des cellules ciliées internes et du nerf auditif en réponse à des stimulations acoustiques, ou avec des stimulations galvaniques si les stimulations sonores sont inefficaces (en cas d'atteinte sévère des cellules ciliées internes). Pour cela, différentes techniques seront employées : les potentiels évoqués auditifs, qui repose sur l'utilisation d'électrodes cutanées, l'électrocochléographie, qui repose sur l'utilisation d'électrodes déposées chirurgicalement au contact de la cochlée et l'enregistrement de l'activité unitaire du nerf auditif, dans lequel les électrodes sont insérées dans le nerf auditif. La pose des électrodes et l'enregistrement des activités électriques est toujours pratiquée chez l'animal anesthésié. Des tests auditifs comportementaux fondés sur le sursaut en réponse à un son, seront également employés pour compléter les données de l'électrophysiologie.

A l'issue de ces tests d'exploration fonctionnelle, les souris seront euthanasiées. Les cochlées et les nerfs auditifs d'une partie d'entre-elles seront prélevés et examinés avec des techniques d'étude anatomiques dans le but d'établir des corrélations avec les résultats des tests fonctionnels.

Cette étude sera menée en conformité avec les recommandations de la règle des 3R.

Remplacer : L'exploration de l'évolution de la fonction auditive par des tests d'exploration fonctionnelle nécessite un animal vivant. De plus, nos modèles de souris transgéniques reproduisent bien les neuropathies auditives de l'homme.

Réduire : Pour chacune des lignées de souris qui seront sélectionnées pour cette étude, un nombre de 36 animaux sera nécessaire et suffisant selon une évaluation statistique. Ce nombre sera donc multiplié par autant de lignées utilisées. Le nombre de lignées que nous pourrons étudier ne pouvant pas excéder 4 par an en raison des contraintes de temps et de disponibilité du matériel d'exploration fonctionnelle, le nombre maximum de lignées de souris utilisées pendant 5 ans (limite supérieure de validité d'une autorisation de projet) sera de $4 \times 5 = 20$ lignées. En conséquence le nombre maximum de souris, toutes lignées confondues, sera de $4 \times 5 \times 36 = 720$.

Raffiner :

- les souris sont hébergées dans un environnement conforme et enrichi
- elles sont anesthésiées profondément lors des tests fonctionnels
- leur état est évalué quotidiennement l'état
- les soins éventuels sont prodigués aux animaux malades
- des points limites et des critères d'arrêt sont respectés en cas de gêne ou souffrance manifestées.

12721 Le but de ce projet est l'étude d'une population de cellules immunitaires particulières : les macrophages résidents. Ces cellules, comme tous les macrophages, assurent une fonction de protection de l'organisme grâce à leur capacité à phagocyter, c'est à dire à ingérer différentes cibles biologiques, en particulier des agents infectieux (virus, bactéries, parasites) mais aussi certaines cellules devenues inutiles (cellules vieillissantes ou endommagées) ou dangereuses (cellules cancéreuses). Ils possèdent aussi la capacité de sécréter différentes substances biologiques permettant d'attirer d'autres cellules immunitaires (cytokines) ou de modifier leur environnement tissulaire (enzyme de digestion de la matrice extracellulaire). Toutes ces propriétés en font des agents majeurs dans la réaction inflammatoire, en cas d'infection, mais aussi dans la cicatrisation et la régénération des tissus lésés.

Les macrophages résidents, qui sont le sujet d'étude de ce projet, se distinguent des macrophages « classiques » par le fait qu'ils ne sont pas générés par les cellules souches hématopoïétiques qui, chez l'adulte, se trouvent dans la moelle osseuse et produisent, tout au long de la vie, l'ensemble des cellules sanguines.

Les macrophages résidents sont, eux, produits très tôt au cours du développement embryonnaire, dans le sac vitellin, une poche extra-embryonnaire qui entoure et protège l'embryon. Ensuite, rapidement, ces macrophages migrent pour coloniser les différents organes du fœtus (cerveau, peau, poumons, foie, rein, etc...) où ils persisteront après la naissance chez l'individu adulte (d'où le qualificatif de « résidents »).

Au cours de la vie adulte, les macrophages résidents ne sont remplacés que partiellement par ceux générés par la moelle osseuse et de manière très variable suivant l'organe concerné. Par exemple, si les macrophages résidents du cœur sont progressivement remplacés par des macrophages « classiques », ceux du cerveau demeurent presque exclusivement d'origine embryonnaire.

La découverte de l'existence des macrophages résidents étant relativement récente, nos connaissances sur leurs propriétés biologiques demeurent encore incomplètes. Etant donné le rôle majeur joué par les macrophages en général dans de nombreux processus biologiques (protection immunitaire, protection contre le cancer, cicatrisation, régénérescence tissulaire), il est important de pouvoir faire la distinction entre les propriétés des deux populations (classiques et résidents) pour mieux comprendre leur rôle pendant le vieillissement de l'organisme.

C'est pourquoi nous avons mis en place ce projet dont l'objectif général est l'étude des macrophages dans les phénomènes physio-pathologiques liés au vieillissement.

En résumé, si ce projet est avant tout un projet de recherche fondamentale sur la biologie du vieillissement et des macrophages, les connaissances qu'il apportera pourront bénéficier, à terme, à des domaines plus appliqués concernant la défense immunitaire ou la réparation tissulaire.

Application de la règle des 3R :

Remplacer : Le recours à l'animal est nécessaire car il n'existe actuellement aucun modèle in vitro pouvant se substituer à l'étude directe du système immunitaire in vivo. En particulier, les essais in vitro sont incapables de reproduire toute la complexité des facteurs impliqués dans les phénomènes de réaction immunitaire ou de vieillissement. De même, la différenciation des macrophages à partir de leurs précurseurs embryonnaires est influencée par des facteurs de la niche fœtale et ne peut pas être reproduite in vitro sans artefact.

Réduire : Un maximum de 676 souris seront utilisées sur 5 ans (532 souris dans 3 procédures légères et 144 dans une procédure modérée). Ce nombre a été limité au maximum en tenant compte de la nécessité de produire des résultats interprétables sur le plan statistique. En particulier, nous

utiliserons de manière intensive la technologie de cytométrie de flux qui permet l'analyse détaillée d'un grand nombre de populations cellulaires de façon simultanée, permettant des analyses statistiques basées sur un grand nombre d'évènements pour chaque animal utilisé. Ceci, allié à l'utilisation rationnelle de différentes lignées de souris transgéniques permettra de maximiser l'efficacité de nos analyses et de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner : Les manipulations les plus douloureuses n'iront pas au-delà de celle infligée par la piqûre d'aiguille lors d'injections intraveineuses ou intrapéritonéales. La seule procédure de classe modérée est l'injection répétée de deux produits qui miment soit une infection virale soit une infection bactérienne et qui ont pour but de provoquer une inflammation de faible niveau mais soutenue dans le temps. Cependant, les doses utilisées ont été choisies en se référant à des protocoles déjà publiés afin de ne pas altérer le bien-être des animaux. De plus, afin de prévenir toute réaction individuelle excessive à ces traitements, une surveillance quotidienne sera réalisée. Si un animal présente des signes évidents de souffrance, le traitement sera arrêté et l'animal mis à mort.

12722 Le cancer du pancréas fait partie des cinq cancers les plus meurtriers avec un taux de survie à 5 ans très faible (8.2%) et une survie de seulement 6 mois. Surnois et difficilement détecté, les patients diagnostiqués ont déjà des atteintes sur des vaisseaux avoisinants ou des organes distants, les 20% restants peuvent recourir à la chirurgie. Les résultats des chimiothérapies demeurent décevants, de nouveaux traitements doivent être urgemment développés afin de limiter/éradiquer ce cancer.

Notre équipe a récemment identifié une enzyme clé de la synthèse de médiateurs lipidiques, les prostaglandines et les leucotriènes, comme une cible métabolique et thérapeutique pertinente dans la lutte contre le cancer du pancréas. Nous avons déjà montré que cette enzyme confère aux cellules tumorales des capacités prolifératives et métastatiques élevées. L'objectif de ce projet est de définir l'impact de l'inactivation de cette enzyme sur le développement de la tumeur et de son microenvironnement (i.e. vaisseaux sanguins et lymphatiques), et in fine de démontrer que le ciblage de cette enzyme constitue une stratégie thérapeutique prometteuse contre ce cancer.

Cette étude sera réalisée à partir de souris dépourvues de lymphocytes T matures et implantées avec des cellules tumorales pancréatiques humaines dans le pancréas. Ce modèle d'étude reproduit fidèlement les caractéristiques anatomopathologiques des tumeurs humaines. Le développement des tumeurs formées sera comparé à celui des tumeurs formées à partir de cellules tumorales pancréatiques dépourvues de l'enzyme d'intérêt.

Application de la règle des 3R :

Remplacer : Le recours à des animaux est indispensable pour ce projet puisque nous souhaitons observer l'efficacité anti tumorale d'un gène dans un modèle préclinique de tumeur pancréatique

Réduire : Le nombre total d'animaux nécessaire à cette étude s'élève à 36, et est réparti en trois groupes expérimentaux (12 individus par groupe). Il a été réduit au minimum requis pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs (risque alpha de 0.05 et une puissance du test de 0.8).

Raffiner : Un enrichissement matériel de l'environnement des animaux (twists ou cocon ou nid) est mis en place dans toutes les cages afin qu'ils expriment un répertoire diversifié de comportements normaux. De plus, les actes chirurgicaux (implantation de cellules tumorales dans le pancréas), l'observation quotidienne des animaux et l'établissement du score de douleur seront réalisés par des personnes compétentes (formations en expérimentation animale et en chirurgie) et toute perte de poids, signe de douleur ou souffrance notable (cardiaque, respiratoire) de l'animal éveillé après anesthésie ou au cours du développement tumoral constituera le point limite de l'expérience.

12723 L'objectif de ce projet est d'identifier des composés chimiques ou biologiques qui pourraient être développés comme nouveaux médicaments dans le traitement de la fibrose du foie et de la stéatose hépatique non alcoolique.

L'apparition d'une fibrose dans le foie (fibrose hépatique) est une complication principale de toutes les maladies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine alcoolique, virale, parasitaire, biliaire ou

autre. La fibrose hépatique se caractérise par un dysfonctionnement des hépatocytes mesurable par une augmentation permanente des taux circulants des enzymes hépatiques, de la bilirubine, et par une altération importante de la production de protéines majeures comme l'albumine et la prothrombine, indispensable à la coagulation. En l'absence de traitement efficace à l'heure actuelle, la fibrose peut évoluer vers une forme plus grave et non réversible, la cirrhose, qui est une cause importante de morbidité et de mortalité chez l'homme. La greffe de foie reste la seule solution envisageable pour le patient à ce stade de la maladie.

La stéatose hépatique non alcoolique ou stéatohépatite métabolique (aussi appelée NASH pour Non Alcoholic Steato Hepatitis) est une pathologie aussi caractérisée par des anomalies du bilan hépatique avec augmentation du taux de transaminases dans le sang. Son diagnostic repose essentiellement sur l'analyse histologique d'une biopsie hépatique qui montre une augmentation des lipides stockés dans les cellules hépatiques accompagnée d'une inflammation, et d'une fibrose plus ou moins marquée en fonction de l'avancement de la maladie. Elle survient chez un patient qui n'a pas d'autre maladie hépatique d'origine virale, auto-immune, génétique ou toxique, et surtout qui n'a pas une maladie alcoolique du foie. Les facteurs de risque pour le développement de la stéatohépatite non-alcoolique sont entre autres la résistance à l'insuline, le surpoids et l'adiposité viscérale. La stéatohépatite métabolique, chez environ un tiers des patients, évolue à travers différents degrés de fibrose vers une cirrhose et favorise l'apparition d'un carcinome hépatocellulaire (CHC).

Les animaux utilisés dans ce projet seront des rongeurs (souris et rats) car la fibrose hépatique dans ces deux espèces est considérée comme suffisamment prédictive de l'efficacité de composés chez l'homme. La majorité des animaux utilisés dans ce projet seront exposés régulièrement à des injections répétées d'un produit chimique déclenchant une inflammation dans le foie, avec pour conséquence l'apparition d'une fibrose en quelques semaines. Dans le cas de la stéatohépatite métabolique, un régime alimentaire riche en lipides et en sucre sera proposé aux animaux, afin de créer un environnement métabolique favorable à l'accumulation de lipides dans le foie. Afin de récapituler les différentes étapes de la pathologie hépatique humaine, un modèle permettant le développement de tumeurs hépatiques sur un fond de stéatohépatite métabolique va être mis en place

Application de la règle des 3R :

Remplacer : Etant donnée la complexité des mécanismes impliqués dans ces deux pathologies, il est difficile de prédire le potentiel thérapeutique d'une molécule uniquement sur la base de résultats in vitro. Il s'avère donc nécessaire d'utiliser un modèle animal qui récapitule les différents aspects de la pathologie humaine, afin de pouvoir évaluer in vivo les meilleurs composés identifiés.

Réduire : Une analyse bio-statistique des données générées dans le modèle de fibrose a déjà été réalisée, afin d'inclure le minimum requis d'animaux par groupe pour obtenir une Réduire significative de 50% de la fibrose dans le foie. Pour le modèle de tumorigénèse, des études pilotes nous permettront de déterminer le nombre d'animaux à inclure dans ce type d'expérience. Ce projet nécessitera une utilisation moyenne de 700 souris et de 300 rats par an, soit 5000 animaux sur la totalité des 5 ans du projet.

Raffiner : Les signes cliniques attendus sont modérés avec une perte de poids transitoire consécutive à chaque exposition à l'agent chimique. Une observation quotidienne des animaux est réalisée afin de noter tout signe clinique anormal, et un avis vétérinaire est demandé en cas de doute. En cas de signes cliniques de souffrance au-delà de ceux attendus, des points limites et des critères d'arrêt sont mis en œuvre.

12724 Les troubles neuropsychiatriques (autisme, dépression) sont aujourd'hui les premières causes de souffrance et d'handicap à l'échelle mondiale. La résistance aux traitements pharmacologiques classiques a mené au développement d'alternatives thérapeutiques, plus prometteuses : les méthodes de neurostimulation. Le progrès considérable réalisé dans les domaines de la stimulation magnétique et électrique profonde souffre cependant de limitations techniques (précision ou chirurgie invasive). Il a été démontré récemment que la stimulation transcrânienne par ultrasons,

c'est à dire l'application d'ondes mécaniques, permettait de moduler l'activité électrique cérébrale de façon non-invasive et géométriquement précise, outrepassant les limites des méthodes actuelles. L'altération de l'activité de certaines zones cérébrales étant caractéristique des troubles neuropsychiatriques, la stimulation ultrasonore pourrait prendre place dans l'arsenal thérapeutique des maladies neuropsychiatriques. Malgré cet intérêt et certaines études exploratoires, les paramètres ultrasonores requis pour une stimulation ultrasonore précise et efficace sont peu ou pas connus. Dans ce contexte, nous proposons de déterminer et d'optimiser les paramètres acoustiques requis pour réaliser une stimulation ultrasonore précise et efficace chez le rat et la souris mâle en conditions physiologiques (non affecté par une maladie neuropsychiatrique). Le choix de ces deux espèces repose sur le fait que nous disposons d'un modèle murin de dépression et d'un modèle rongeur d'autisme sur lesquels nous appliquerons, dans une deuxième phase, les paramètres acoustiques optimaux développés dans ce projet.

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

Remplacer : Dans une première approche expérimentale, nous avons mis en place et validé un dispositif expérimental permettant la stimulation ultrasonore. Dans la continuité de ce projet, nous souhaitons aujourd'hui optimiser les paramètres acoustiques requis pour réaliser une stimulation ultrasonore précise et efficace. Par conséquent, à cette étape du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle d'étude in-vitro ou in-silico.

Réduire : Sur la base de nos études antérieures, notre étude nécessite 152 souris et 152 rats. Les groupes contrôles et expérimentaux seront constitués de 8 animaux.

Raffiner : Les animaux seront hébergés par groupe de 8 pour les souris et par 2 pour les rats en présence d'un objet d'enrichissement. Les animaux seront observés une fois par jour. Les procédures expérimentales sous anesthésie générale et les animaux sont manipulés sur un tapis chauffant avec une restriction minimum de l'isolement social. Les animaux sont placés sous surveillance à leur réveil. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12725 Contexte et objectif

La rétine est soumise à des pathologies neurodégénératives comme la rétinopathie pigmentaire, ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge qui sont des causes majeures de cécité et restent à l'heure actuelle intraitables. Parmi les différentes stratégies thérapeutiques actuellement développées, notre équipe s'intéresse à la capacité régénérative de la rétine. Alors que les amphibiens et les poissons régénèrent très efficacement leur rétine à partir des cellules gliales de Müller, les mammifères n'en sont pas capables. Il a cependant été démontré que les cellules de Müller des mammifères possèdent un potentiel de régénération. L'objectif du présent projet de recherche est donc de trouver les molécules capables de réveiller ce pouvoir régénératif des cellules de Müller dans des modèles de dégénérescence rétinienne de souris. Pour ce faire, nous souhaitons surexprimer par injection dans les cellules de Müller grâce à des virus de type « adénovirus associé » une protéine appelée YAP qui est connue dans d'autres organes (le foie, l'intestin, le cœur) pour sa capacité pro-régénérative.

Avantages et dommages escomptés

L'existence de la lignée rd10 de souris, atteinte spontanément de dégénérescence rétinienne, en fait un excellent organisme modèle pour notre projet. Le caractère non dommageable de cette lignée murine a été validé dans une précédente DAP. Une part importante de nos expériences n'est pas soumise au dépôt de demande d'autorisation de projet car réalisées sur animaux euthanasiés pour prélèvements d'organes. Les phénotypes des animaux utilisés sont restreints à la rétine, un organe non-vital et dont la perte totale de fonction n'altère pas la vie des animaux. Les différentes procédures qui seront effectuées ont un niveau de sévérité de classe légère et sont couramment utilisées dans le domaine de la recherche ophtalmologique (ou clinique).

Nombre et type d'animaux utilisés sur 5ans

Nous prévoyons d'utiliser 620 animaux pendant la durée de 5 ans du projet (364 souris sauvages C57Bl6/J et 256 mutants spontanés de la lignée rd10).

Conformités avec la règle des 3R :

Remplacer : afin d'éviter douleur et inconfort à l'animal, nous souhaitons remplacer autant que possible les manipulations in vivo par des expériences de culture ex vivo d'explants de rétines provenant d'animaux sacrifiés. Cette technique est un bon modèle alternatif de dégénérescence rétinienne pour tester des molécules neuroprotectrices ou régénératives, et dans notre cas pour tester les conséquences de la surexpression de YAP dans les cellules de Müller. Cependant celui-ci ne se substitue pas au modèle in vivo chez l'animal car il ne récapitule pas toute la physiologie d'un œil.

Réduire : Le nombre d'animaux par groupe correspond au minimum nécessaire pour une démonstration convaincante des principes scientifiques étudiés sur la base d'arguments statistiques valides. En prenant en compte les variabilités d'efficacité des infections des adénovirus associés dans les yeux des souris, nous avons estimé à 8 souris le nombre d'animaux minimum nécessaires par groupe. Nous utiliserons des tests statistiques paramétriques et non paramétriques. A noter également que dans l'optique de réduire le nombre d'individus par expérience, nous planifions systématiquement plusieurs analyses en même temps, de sorte que les deux rétines de chaque individu sont utilisées : par exemple l'une pour une analyse d'expression de gènes et l'autre pour une analyse d'expression de protéines.

Raffiner : les animaux sont élevés dans un environnement contrôlé et enrichi. Nous aurons recours aux procédures anesthésiques appropriées. Les points limites de nos expériences sont déterminés en fonction de la santé générale des animaux ayant subi des manipulations de leur vivant. Les doses d'adénovirus associés injectés seront réajustées suite à la survenue de manifestations extérieures de mal-être. Cependant leur innocuité a été largement rapportée dans la littérature.

12726 En écologie, la prédation est une pression évolutive importante qui influence le changement de comportement des proies. Les comportements anti-prédateurs les plus répandus, comme la réduction de l'activité et l'utilisation de cachettes, augmentent la probabilité de survie et sont donc bénéfiques. Cependant, ces comportements ont également un coût car ils réduisent le temps investi dans d'autres activités essentielles telles que l'alimentation et la reproduction. L'expression de ces comportements anti-prédateurs est donc ajustée en fonction du risque de prédation estimé par les individus. Un individu peut estimer ce risque soit par sa propre rencontre avec un prédateur soit l'information possédée par d'autres individus. Afin de répondre au risque dès le plus jeune âge, les nouveau-nés peuvent ainsi utiliser l'information de la génération précédente grâce aux effets parentaux et réadapter ensuite leurs défenses comportementales en fonction de leur propre information tout au long de leur vie.

L'objectif de ce projet est d'étudier le développement des défenses comportementales, et les mécanismes génétiques sous-jacents, chez le lézard vivipare (*Zootoca vivipara*) en réponse à l'exposition au risque de prédation à travers plusieurs générations. Le lézard vivipare est l'espèce de lézard la plus répandue en Eurasie et même si elle est sensible aux dégradations de son milieu, elle est classée comme espèce à préoccupation mineure par l'UICN. Les comportements anti-prédateurs et les effets parentaux sont bien connus chez cette espèce, ce qui en fait un modèle adéquate pour étudier des mécanismes qui peuvent être difficile à étudier chez d'autres espèces animales.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Dans un contexte de changements globaux, dans lesquelles les relations proies-prédateurs sont bouleversées, il est essentiel de comprendre l'adaptation des proies aux changements de pression de prédation au travers du règne animal. En particulier, les reptiles restent peu étudiés alors qu'ils représentent 15% des espèces de vertébrés et que 20% des espèces de reptiles sont en danger (<https://www.iucn.org/fr/content/pr%C3%A8s-d%E2%80%99un-reptile-sur-cinq-lutte-pour-la-survie>). Nous allons utiliser des lignées de lézards qui sont nés en captivité dans des enclos semi-naturels. Par conséquent aucun animal ne sera capturé en milieu naturel. Au total

nous étudierons 3 générations de lézards, correspondant à un nombre approximatif maximal de 500 lézards. Nos traitements de risque de prédation (odeur de prédateur ou contrôle) sont appliqués à 3 générations de manière similaire ou non afin de distinguer l'effet du risque à chaque génération. Cela crée donc 8 traitements. Le nombre de lézards a été calculé afin d'avoir suffisamment d'individus mâles et femelles dans chaque traitement.

Réduire : Au niveau statistique, nous pourrions ainsi tirer des conclusions robustes de nos observations.

Raffiner : Tous les ans, les individus sont capturés, ramenés au laboratoire et gardés en terrariums individuels dans des conditions optimales respectant la réglementation européenne ainsi que les exigences biologiques de l'espèce. Les traitements de risque de prédation sont appliqués durant maximum un mois par an afin de minimiser le stress induit tout en permettant une réponse comportementale. Une fois par an, à chaque stade de vie, nous allons échantillonner un petit morceau de queue, la queue de cette espèce se régénère rapidement, pour analyser l'expression des gènes impliqués dans les défenses anti-prédatrices. Des tests comportementaux non-invasifs seront effectués une fois par an afin d'estimer les réponses comportementales au risque de prédation. Toutes ces procédures ne sont effectuées qu'une seule fois par an afin de minimiser leur impact sur la santé et le devenir des individus. De plus ils ont été montrés comme n'influençant pas la survie, la reproduction et la croissance des individus testés par rapport à ceux testés.

12727 La Tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle qui permet d'explorer in vivo de manière non-invasive chez l'Homme, la physiologie et la physiopathologie du système nerveux central et périphérique. L'imagerie moléculaire en TEP est de plus en plus employée en clinique pour le diagnostic et le suivi thérapeutique de certaines pathologies comme le cancer ou les maladies neurodégénératives. Cette technique nécessite le développement, la validation et l'utilisation de molécules (dites radiotraceutes) spécifiques de cibles moléculaires et impliqués dans les phénomènes biologiques à étudier. Ces molécules, marquées par des isotopes radioactifs, sont injectées par voie intraveineuse avant l'acquisition des images TEP.

La validation de ces radiotraceutes comporte plusieurs étapes depuis la sélection de la molécule, son radiomarquage, sa caractérisation biochimique et pharmacologique in vitro, jusqu'à son essai chez l'animal (requis par la réglementation) puis son utilisation chez l'Homme. Ces nouveaux radiotraceutes permettent de réaliser des images de certaines cibles moléculaires (récepteur particulier, dépôt de plaques amyloïdes, etc....) permettant ainsi d'étudier le rôle de ces cibles dans certaines pathologies.

Le but de ce projet est de caractériser et de valider des radiotraceutes pour la TEP chez le rongeur. Ce projet impliquera le développement de 10 radiotraceutes sur une période de 5 ans.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'étape d'évaluation pharmacologique chez le rongeur intervient seulement après une phase de validation chimique et pharmacologique in vitro (sur des cellules, des membranes tissulaires, etc..) et constitue l'ultime étape avant son utilisation chez le primate non humain et chez l'Homme. La validation de ces radiotraceutes chez l'animal est requis par la réglementation.

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire pour cette étude (384 animaux nés et élevés dans un élevage agréé) a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque expérience, à des données de la littérature, et à des études précédemment réalisées dans le cadre de projets semblables concernant le développement de radiotraceutes pour TEP. Ceci nous a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences.

Raffiner : Les conditions expérimentales mises en œuvre dans ces protocoles sont semblables à celles utilisées chez l'homme (imagerie non invasive, injection d'une dose non pharmacologique de radiotracteur). Par ailleurs, l'animal est anesthésié pendant l'examen. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de

prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre les traitements appropriés.

12728 En dépit de l'augmentation du nombre de chevaux en Europe liée à l'engouement pour les activités de loisir équestre, les élevages équinés présentent des revenus faibles. Des travaux récents soulignent les marges d'amélioration permises par une meilleure maîtrise des coûts de production, en particulier des charges d'alimentation. Ces charges sont moins élevées dans les exploitations où les chevaux de selle sont associés à un atelier de production bovine, généralement des bovins allaitants. Il semble que ce soit le fruit d'une meilleure valorisation des surfaces herbagères en systèmes mixtes sans qu'il soit encore possible de discerner ce qui relève de la conduite des éleveurs ou de la synergie entre espèces. Notre projet vise à préciser si le pâturage mixte chevaux-bovins, comparativement à un pâturage équin à même chargement : (i) permet une meilleure valorisation de la végétation à l'échelle de la parcelle du fait des différences d'exigence et de sélectivité alimentaire entre espèces, (ii) accroît la productivité et la valeur nutritive du couvert végétal via une diminution de la biomasse résiduelle (exploitation des refus de l'autre espèce) et une répartition plus homogène des déjections, (iii) réduit l'infestation des chevaux par les nématodes gastro-intestinaux via un phénomène de dilution, ce qui permettrait de réduire le recours aux anthelminthiques chimiques vis à vis desquels les parasites développent des résistances (iv) accroît en conséquence les performances zootechniques des chevaux. Notre projet analyse également les possibles limites de la mixité chevaux-bovins : dynamique d'infestation des chevaux et des bovins par *Trichostrongylus axei*, seul nématode commun aux deux espèces ; comportements agonistiques entre chevaux et bovins et/ou modifications de paramètres comportementaux ; dynamique de la diversité prairiale consécutive à une plus forte homogénéisation de la structure du couvert en pâturage mixte.

Le dispositif expérimental, conduit sur au moins 3 saisons consécutives de pâturage (avril à octobre), comprend 3 blocs réplicas (5.4ha) de prairies permanentes. Chaque bloc est divisé en 2 parcelles (2.7ha), l'une pâturée par 4 poulains de selle de 2 ans, l'autre par 2 poulains de selle de 2 ans et 3 génisses limousines d'1 an. Soit un total maximum de 135 animaux. Les traitements sont équilibrés sur la base du chargement exprimé en Unité Gros Bétail (1.37UGB/ha) et du niveau de consommation d'herbe des animaux. Les individus sont changés chaque année pour répéter le dispositif avec des animaux du même âge. Chaque année, les mesures impliquées dans les 6 parcelles concernent: (i) le suivi de l'alimentation des chevaux et des bovins en mai, juillet et septembre: enregistrement de la durée de pâturage sur 24h à l'aide de colliers d'enregistrement automatique, observations directes des choix alimentaires sur une journée, estimation de la digestibilité du régime des poulains à partir du dosage de l'azote fécal sur des échantillons de fèces individuels ramassés au sol ; (ii) le suivi de l'infestation des parcelles et des animaux par les nématodes gastro-intestinaux: prélèvements d'herbe pour compter et identifier les espèces de larves infestantes (avril, juillet, septembre), prélèvements rectaux d'échantillons de fèces de chevaux et de bovins pour déterminer leur niveau d'infestation individuelle (9 prélèvements sur la saison), mises en culture des fèces prélevés pour identifier les larves produites à partir des œufs ; (iii) des pesées des poulains et des génisses (début et fin de la saison de pâturage et toutes les 2 à 3 semaines au cours de la saison), des mesures d'état corporel des poulains par palpation manuelle (début et fin de la saison de pâturage), des mensurations sur les poulains (début et fin de la saison de pâturage) ; (iv) des mesures sur le couvert végétal: biomasse, valeur nutritive, caractérisation des types de bouchées disponibles dans la parcelle qui, comparés aux bouchées prélevées par les animaux au cours de leur observation, permettront de déterminer leur sélectivité (mai, juillet, septembre), hauteurs d'herbe, composition botanique ; (v) des observations directes des interactions sociales entre les poulains et les génisses sur l'ensemble de la saison.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Pour répondre à notre objectif, centré sur le progrès de l'élevage animal, l'utilisation des espèces concernées est donc indispensable

Réduire : Le nombre d'animaux utilisé dans notre étude et sa durée sont cohérents avec ceux de différents travaux publiés analysant les effets de modes de conduite contrastés des herbivores au

pâturage. La répétition du dispositif sur 3 années est nécessaire pour obtenir un nombre de données suffisant et pour apprécier les effets cumulés des deux modalités de pâturage sur le couvert végétal.

Raffiner : Les stratégies utilisées pour réduire le stress ou la douleur sont : (i) au plan de la conduite : des animaux maintenus en lots avec plusieurs individus de la même espèce, l'utilisation de chevaux du même âge élevés sur place et ensemble dès leur plus jeune âge, l'utilisation de bovins du même âge et provenant du même élevage, des animaux habitués aux intervenants avant les manipulations, une conduite au pâturage avec un chargement adapté et avec un apport de fourrages en cas de sécheresse, (ii) l'intervention de personnels habitués et formés aux manipulations, (iii) un suivi quotidien de l'état et du comportement des animaux, un suivi du poids toutes les 2 à 3 semaines, un suivi de la charge parasitaire toutes les 4 semaines. Des règles sont fixées pour traiter chimiquement les animaux au delà d'un certain seuil d'infestation ou en cas de dégradation d'état général.

12729 Dans le cadre de la recherche de nouvelles thérapies dans les pathologies cardiaques, la souris est un le modèle animal qui constitue une approche fréquemment utilisée. En effet, leur système cardiovasculaire est similaire à celui de l'Homme, les capacités d'analyses ainsi que l'accès aux souris génétiquement modifiées rendent cette approche très efficace pour déterminer les pathologies ainsi que les composés thérapeutiques efficaces et susceptibles d'être utilisés chez l'Homme.

Dans le cadre de cette demande, nous souhaitons mettre en place au sein de notre institut un modèle de constriction de l'aorte ascendante, provoquant une insuffisance cardiaque. Ce modèle vise à établir une augmentation de la pression à l'intérieur du cœur dont les parois vont s'épaissir. Cela entraînera une altération de sa capacité à se contracter et fatiguera ce muscle ; c'est l'insuffisance cardiaque (IC), cause majeure de décès chez l'Homme.

Dans cette étude, nous souhaitons mettre en place ce modèle d'IC chez la souris et nous étudions l'effet de deux gènes qui ont été identifiés chez des patients atteints de problèmes cardiaques.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Le modèle Souris permet d'étudier de manière complète le système cardiaque, tel qu'il peut être affecté chez l'Homme. Nous ne pouvons pas réaliser ce type d'étude dans des modèles in vitro ou in silico, car la complexité du système cardiaque n'est actuellement pas reproduite par ces outils. Nous pouvons ainsi réaliser une chirurgie permettant de simuler la pathologie observée chez l'Homme, et faire le suivi avec des outils similaires à la clinique humaine (échographie, suivi de la pression artérielle...)

Réduire : Dans ce projet, nous comptons utiliser un total de 60 animaux. Ces animaux seront répartis selon deux protocoles : 30 animaux seront nécessaires pour la mise en place du protocole chirurgical et exploratoire. Il se peut qu'on n'utilise pas la totalité de nombre d'animaux si nous jugeons que la chirurgie a été maîtrisée avant.

Dans un second temps, nous utiliserons 30 animaux (10 souris contrôle opérées, 10 souris opérées génétiquement altérées pour chacun des deux gènes). Ces animaux seront leur propre contrôle durant le protocole. Cela nous permet de réduire autant que possible les effectifs nécessaires dans ce projet, tout en conservant une capacité d'analyse suffisante pour les procédures utilisées. Nous avons des données préliminaires sur modèles génétiquement modifiés qui présentent une modification du trouble cardiaque.

Raffiner : Toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale. Une attention particulière est mise sur la gestion de la douleur post-opératoire faisant suite à la chirurgie induisant le modèle de constriction aortique. Des antidouleurs de la famille des opiacées et des anti-inflammatoires seront utilisés afin d'éviter toute douleur chez nos animaux. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt. Les animaux seront hébergés dans des conditions de stabulation optimales, avec un milieu enrichi.

12730 Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est une des pathologies chroniques les plus répandues touchant près d'un milliard de personnes dans le monde. Le SAOS correspond à des épisodes répétitifs de collapsus pharyngés complets (apnées) ou incomplets (hypopnées) pendant le sommeil. L'hypoxie intermittente chronique (HIC), caractéristique majeure du SAOS, est responsable de lésions multi-organes, et notamment de troubles métaboliques et cardiaques. Un problème majeur auquel nous sommes confrontés pour mettre en œuvre une médecine personnalisée dans le SAOS est le manque de connaissances des mécanismes/biomarqueurs biologiques à l'origine des complications associées au SAOS.

Des études chez le rongeur ont démontré que l'HIC induit un remodelage cardiaque fibrotique ainsi qu'une dysfonction contractile. Il a également été précédemment montré que l'HIC induisait de profondes altérations de structure et fonction du tissu adipeux viscéral (TAV) et contribuait à la progression de l'athérosclérose. Les interconnexions entre le TAV et le système cardiovasculaire suscitent un intérêt croissant, mais leurs interactions dans le contexte du SAOS sont peu connues. Il a également été récemment souligné le rôle de la sénescence du TAV dans le processus de fibrose cardiaque induite par le vieillissement via la libération de facteurs profibrotiques, et, chez des patients apnéiques, il a été montré que l'HIC contribue de manière significative au processus de sénescence. Ainsi, l'objectif principal de notre projet est de démontrer que l'HIC induit la sénescence du TAV, responsable du remodelage fibrotique et de la dysfonction contractile cardiaque. Ce projet utilisera différentes méthodes afin de valider de façon robuste nos hypothèses et nécessitera l'utilisation de 280 souris.

Les procédures expérimentales utilisées pour ce projet n'apporteront aucune souffrance à l'animal. Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Il n'est pas possible de réaliser notre étude dans un modèle autre qu'animal au vu des altérations et modifications systémiques que nous nous attendons de voir.

Réduire : Le calcul de nos effectifs est réalisé de manière à utiliser le moins d'animaux possible sans altérer la puissance et la fiabilité de nos tests statistiques.

Raffiner : les animaux seront hébergés en groupes, dans un environnement enrichi et leur bien-être sera vérifié quotidiennement. Les animaux s'adaptent rapidement à l'exposition à l'hypoxie intermittente. Les mesures d'échographies cardiaques et la lipectomie seront réalisées sur animaux anesthésiés. Suite à la lipectomie, les animaux recevront un traitement analgésique. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12731 Le mélanome cutané est très métastatique et les chances de survie après dissémination sont très faibles. Les plus récentes immunothérapies sont efficaces contre les métastases chez environ 30% des patients dans un premier temps mais des résistances apparaissent souvent après quelques mois. Actuellement, ces mécanismes de résistance sont peu connus et il est nécessaire de les comprendre pour pouvoir les contrer.

Le but de ce projet est à la fois de mieux comprendre ce qui permet aux métastases du mélanome cutané d'échapper à ces immunothérapies et de trouver des alternatives.

Les mélanomes surexpriment souvent la molécule membranaire PD-L1 qui se lie au récepteur PD-1 présent principalement sur les lymphocytes T. Ces lymphocytes sont des cellules immunitaires servant entre autres à tuer les cellules anormales dans notre organisme, comme les cellules cancéreuses, via un effet cytotoxique. L'interaction entre ce ligand et ce récepteur inhibe cet effet toxique et permet ainsi à la cellule cancéreuse d'échapper à ce système immunitaire. Les immunothérapies les plus prometteuses agissent en bloquant la liaison PD-L1/PD-1 et rétablissent alors l'effet cytotoxique des lymphocytes T. Pour comprendre les mécanismes de résistance qui se mettent en place lors de ces traitements, il est indispensable d'identifier ce qui régule l'expression de PD-L1 dans le mélanome. Pour cela, nous avons mis en place un système de criblage in vitro qui nous permette d'identifier les gènes qui augmentent le plus l'expression de PD-L1 à la membrane plasmique des mélanomes. Après identification in vitro des gènes régulateurs les plus importants, il nous sera nécessaire de valider leur implication dans la progression tumorale en contact avec le système immunitaire. De plus, connaissant de base des molécules qui inhibent ces

régulateurs, nous pourrions tester leur potentiel à stopper ou diminuer la progression tumorale in vivo afin d'identifier de nouveaux médicaments pour traiter le mélanome cutané.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'utilisation d'animaux vivants pour ce projet est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité le développement des tumeurs et métastases du mélanome, retrouvé chez la souris, en interaction avec le système immunitaire, primordial dans ce projet. Il est également indispensable de maintenir l'hétérogénéité du micro-environnement tumoral, et la souris mime fidèlement celui retrouvé chez l'Homme, mettant en jeu une série d'interactions non reproductibles in vitro, in silico ou ex vivo. Nous avons conclu qu'aucune méthode alternative ne pourra répondre aux réponses physiopathologiques attendues. Enfin, notre projet offre une opportunité thérapeutique.

Réduire : 908 souris seront utilisées au maximum pour ce projet. L'identification préalable in vitro nous permet de sélectionner les régulateurs les plus importants, ce qui réduit au mieux le nombre de souris.

Raffiner : Les manipulations seront réalisées en prenant en considération le bien-être de l'animal dans le souci constant de réduire au minimum l'inconfort et la souffrance des animaux (examens cliniques, surveillance étroite, anesthésie et analgésie dès que nécessaire). Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12732 Le Département du Haut-Rhin a engagé un programme de restauration écologique des cours d'eau. Ce programme doit permettre l'atteinte du bon état écologique des masses d'eau, selon les objectifs fixés par la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE), et en particulier la restauration de la continuité écologique. La notion de continuité écologique, introduite dans la DCE, a été réaffirmée dans la loi sur l'eau et les milieux aquatiques (LEMA). Elle vise notamment à rétablir la libre circulation des organismes aquatiques et leur accès aux zones indispensables à leur reproduction, leur croissance, leur alimentation ou leur abri. Depuis plusieurs années, de nombreuses actions de restauration de la continuité ont été réalisées dans les rivières du Haut-Rhin, conduisant notamment à la construction de passes à poissons. Toutefois, il n'y a pas eu de suivi scientifique permettant d'évaluer le bénéfice de ces actions sur la faune piscicole.

Le présent projet vise à évaluer l'attractivité et la franchissabilité de 8 passes à poissons (existantes ou en cours de réalisation d'ici 2019) sur deux cours d'eau et pour différentes espèces de poissons (principalement truite, chabot et dans une moindre mesure chevaine, vandoise et barbeau, tout dépendra des espèces réellement présentes sur site). L'objectif connexe est de mesurer les migrations piscicoles à plus large échelle (franchissement de plusieurs ouvrages).

Le projet propose de poursuivre l'étude sur une durée de 3 ans le comportement migratoire d'un échantillon de 5700 poissons sauvages marquées à l'aide de puces RFID (PIT tags) et détectés à l'aide d'antennes de détection fixes. Les individus seront capturés à l'aval et à l'amont direct des passes et remis sur le secteur de leur capture. Les passes à poissons seront équipées d'antennes de détection en amont et en aval, permettant de détecter l'entrée et la sortie d'un individu dans la passe. Une antenne supplémentaire pourra être ajoutée dans certains cas plus en aval dans le lit du cours d'eau pour évaluer l'attractivité de la passe.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la question posée ; en outre, il est indispensable d'avoir recourt à des poissons sauvages pour étudier leur comportement in natura.

Réduire : L'effectif de 5700 individus marqués toutes espèces confondues (2700 truites fario, 1200 chabots, 1200 chevaines ou vandoises et 600 barbeaux) est le minimum pour obtenir un échantillon représentatif des comportements migratoires au sein de la population pour évaluer la variabilité interannuelle de ces comportements, tout en limitant au maximum les atteintes sur la population

Raffiner En effet, seule une fraction minoritaire des individus va migrer, l'autre fraction est résidente et ne sera pas détectée. Les marques PIT tags seront implantées dans la cavité péritonéale. Les

animaux seront anesthésiés lors de l'opération, leurs constantes vitales seront surveillées et leur réveil post-opératoire assuré avant de les relâcher dans le milieu naturel.

12733 Un dysfonctionnement du système immunitaire peut provoquer la rupture de la tolérance au soi et être à l'origine du développement de maladies auto-immunes. Ainsi, la connaissance approfondie des mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance représente un enjeu capital pour améliorer à la fois la compréhension et le traitement des maladies auto-immunes.

Des rats Sprague Dawley (SD) déficients pour l'IL34, une cytokine régulatrice, ont été croisés avec des rats SD génétiquement modifiés pour que les cellules exprimant FoxP3, un facteur de transcription de cellules régulatrices, expriment aussi un fluorochrome : la GFP (ces rats sont identifiés déficients IL34/FoxP3-GFP) permettant ainsi d'analyser facilement ces cellules. Grâce au croisement de ces lignées, il est donc possible d'analyser spécifiquement l'impact de la déficience en IL34 dans les cellules exprimant FoxP3 grâce au fluorochrome. Ainsi, l'objectif est de comparer les fonctions régulatrices des cellules exprimant FoxP3 et déficientes en IL34 (déficient IL34/FoxP3-GFP) aux cellules régulatrices de rats WT exprimant FoxP3 (WT/FoxP3-GFP) à inhiber la prolifération de cellules effectrices dans un modèle in vivo de "maladie de perte" de poids, modèle expérimental de maladie auto-immune. Les cellules sont injectées chez des rats déficients pour le récepteur gamma de l'IL2 (IL2Rgamma déficient SD), en effet ces rats sont immunodéprimés, ainsi ils ont très peu de cellules pouvant réagir contre les cellules injectées évitant leur rejet.

Le nombre maximum d'animaux utilisé sera de 50

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie :

Remplacer : Des études fonctionnelles ont été réalisées in vitro, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence de contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études in vivo.

Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit au nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de groupe a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Les courbes de survie des rats seront analysées par Kaplan Meyer et la perte de poids par Two Way Anova suivi d'un Bonferroni post test.

Raffiner : Les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement seront euthanasiés. Tous les animaux seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information postmortem, au niveau anatomo-pathologiques des tissus. Des objets d'enrichissement sont placés dans les cages afin de limiter l'angoisse des animaux. De plus, afin de réduire la douleur des animaux, l'injection des cellules en iv sera réalisée sous anesthésie par Isoflurane (3.5%), et un tableau de score a été établi avec administration de BUPRENORPHINE (50 mg/kg Intra musculaire) et MELOXYCAM (0,3mg/kg Sous cutanée) si les rats ont atteint un score de 2-3.

12734 La filière équine traverse actuellement une turbulence autour du risque sanitaire, en particulier, avec une épizootie de grippe et d'autres affections respiratoires qui pénalisent les secteurs d'activité des courses majoritairement mais également celui des sports et des élevages. La vaccination reste le meilleur rempart collectif et individuel. Pouvoir modéliser une exploitation agricole produisant des chevaux avec un mode d'élevage et de gestion, à la fois traditionnel en valorisant au maximum la ressource fourragère et des animaux en plein air au cours de la saison ad hoc, et des habitats hivernaux classiquement retrouvés dans les établissements de la filière, allié à un suivi au quotidien exceptionnel de la troupe de 200 chevaux pour répondre aux besoins la recherche, relevés de données zootechniques systématiques, permet de répondre aux sollicitations des laboratoires pharmaceutiques vétérinaires pour réaliser des tests vaccinaux afin d'évaluer l'immunogénicité d'un protocole vaccinal, ou bien de vérifier l'innocuité de leurs produits commerciaux en condition terrain, en conséquence, aucun dommage n'est attendu. L'éventail des statuts physiologiques, animaux en croissance, jeunes adultes, femelles gestantes, en lactation dans un contexte contrôlé permet de limiter le nombre d'individus dans chacun des groupes d'études. Les projets peuvent s'intéresser à

des individus naïfs ou non pour l'immunogène cible afin de tester en condition d'élevage le suivi et l'évaluation des produits vétérinaires.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Pour le suivi et l'évaluation dans des conditions d'élevage des produits vétérinaires, nous avons besoin de réaliser ces essais sur des animaux vivants de l'espèce cible du produit.

Réduire : Le nombre d'animaux est réduit au nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats solides pour notre projet

Raffiner : Préalablement à la vaccination un examen clinique avec relevé de température corporelle sera réalisé. Seuls les animaux en bon état général seront vaccinés. Au cours de l'étude, tout animal malade sera examiné par un vétérinaire et traité. Toute urgence sera prise en charge immédiatement par un vétérinaire pour éviter une souffrance à l'animal. Les procédures dans lesquelles sont engagés les animaux sont de classe légère.

12735 Le projet consiste à valider le rôle antiparasitaire potentiel d'enzymes humaines présentant une activité de type lipide-hydrolase, dans le paludisme.

Le paludisme est une maladie due à un microorganisme parasite, Plasmodium, qui se développe principalement dans les globules rouges de son hôte mammifère.

Chez l'Homme, une activité de type lipide-hydrolase, plus précisément la phospholipase A2 de groupe IIA (PLA2 IIA), est naturellement présente à faible concentration dans le sang et son taux est augmenté lors d'inflammation ou d'infection. C'est le cas dans le paludisme, où son rôle est inconnu. Nous avons montré que d'autres phospholipases A2 humaines, non circulantes, peuvent inhiber la croissance de Plasmodium en culture in vitro, ce qui suggère qu'elles pourraient contribuer à la défense contre le parasite chez les patients impaludés. Afin de valider cette hypothèse, nous nous proposons 1) de vérifier si des souris transgéniques pour la PLA2 IIA luttent mieux contre le parasite que des souris non-transgéniques, 2) d'analyser si une PLA2 (IIA ou autre), ou un substrat de la PLA2 IIA, peuvent avoir un effet thérapeutique par injection à des souris WT (wild type) parasitées.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Ces expériences ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives puisqu'elles sont intégratives et nécessitent donc d'étudier les problématiques exposées ci-dessus sur des organismes entiers.

Réduire : Ces expériences, réparties sur une durée de 5 ans, seront réalisées sur un nombre maximal de 565 souris (224 souris génétiquement modifiées (transgéniques) et 341 souris C57BL/6 WT), nombre suffisant pour vérifier si l'enzyme humaine est susceptible d'inhiber la croissance parasitaire in vivo et de modifier le profil physiopathologique de l'infection. Cela permettra aussi d'explorer les potentialités thérapeutiques des PLA2 et de leurs substrats

Raffiner : Les animaux seront maintenus en cage dans le respect de la réglementation (taille des cages, enrichissement, nourriture, soins...). Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt pour éviter aux animaux toute souffrance tout au long de leur vie

12736 Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération incontrôlée des cellules de l'organisme devenues tumorales. Les vecteurs lentiviraux sont particulièrement intéressants pour une approche vaccinale thérapeutique dans le domaine de l'oncologie car ils permettent d'activer les globules blancs, qui jouent un rôle majeur dans le contrôle de cette prolifération. Cependant, ces vecteurs lentiviraux sont encore très peu utilisés lors d'essais cliniques et nécessitent d'être étudiés plus en détails (contrairement aux vecteurs adénoviraux plus largement utilisés).

Nous avons récemment montré que les vaccins lentiviraux que nous avons construits sont très efficaces pour l'élimination de tumeurs dans plusieurs modèles murins. L'existence de protéines spécifiques présentes uniquement dans les cellules tumorales permet de cibler les tumeurs.

La vaccination avec des lentivirus permet ainsi d'induire des cellules spécifiques de ces protéines de tumeurs et capables de tuer les cellules tumorales avec une toxicité très faible pour le reste de

l'organisme. Dans plusieurs modèles, nous avons ainsi montré que les tumeurs sont totalement éliminées en 20 à 30 jours après vaccination.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes impliqués et d'optimiser ces vaccins lentiviraux thérapeutiques dans le but d'éliminer les cellules tumorales et de favoriser la mise en place d'une réponse mémoire la plus efficace possible. Plusieurs paramètres seront analysés dans ce projet comme la dose vaccinale, l'optimisation du type de vecteur vaccinal ou encore la mise en place d'une réponse mémoire efficace. Un autre aspect étudié dans ce projet sera la comparaison entre une vaccination effectuée par un vecteur adénoviral et un vecteur lentiviral. En effet, les vecteurs adénoviraux sont plus communément utilisés que les vecteurs lentiviraux et nous souhaitons déterminer si les vecteurs lentiviraux sont plus efficaces pour des approches de vaccination anti tumorale. Les mêmes antigènes vaccinaux seront donc utilisés avec le système lentiviral ou adénoviral et l'activité anti tumorale sera comparée post vaccination.

Le bénéfice attendu de ce projet est le développement de vaccins thérapeutiques en oncologie humaine et plus particulièrement dans les cas de cancers induits par le papillomavirus, le cancer de la prostate, le cancer de la vessie et le cancer du côlon. Les expériences de ce projet ont pour but de décrire en profondeur les mécanismes impliqués dans une vaccination anti tumorale, ainsi que d'optimiser les vaccins candidats. La majorité des expériences de ce projet consistent à implanter une tumeur solide dans une série d'animaux, en injectant des cellules tumorales par voie sous cutanée qui en se multipliant vont former une tumeur solide en quelques jours. Une partie de ces animaux sera alors vaccinée alors qu'une seconde partie sera traitée avec un vaccin contrôle (un vaccin sans les gènes tumoraux) et la troisième partie restera non traitée. La croissance tumorale est ensuite suivie par des mesures régulières de la taille de la tumeur. Pour évaluer l'activation du système immunitaire, les animaux seront mis à mort à différents temps après l'implantation tumorale et la vaccination puis les organes (rate, ganglions et tumeur) seront prélevés et analysés.

Dans le respect de la règle des 3R,

Remplacer : Les conditions à tester lors des expériences seront déterminées par des expériences réalisées *in vitro* dès que cela sera possible. Mais pour l'heure, avant d'envisager leur utilisation chez l'homme, nous devons d'abord établir la faisabilité de cette technique dans un organisme vivant en caractérisant les réponses immunitaires et anti tumorales induites par la vaccination. Ces réponses doivent être évaluées dans un organisme vivant du fait de la complexité des phénomènes impliqués.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit tout en conservant un minimum permettant d'obtenir des résultats significatifs. Le nombre d'animaux à utiliser a été déterminé avec l'aide d'un biostatisticien et des tests statistiques de type ANOVA seront utilisés pour déterminer la significativité de nos résultats.

Raffiner : De plus, des points limites ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt (prostration, faiblesse pour se déplacer ou masse tumorale >1500mm³).

Le projet comporte 1 procédure légère (100 souris) et 7 procédures modérées (1720 souris) pour un total de maximum 1820 souris.

12737 L'obésité est reconnue comme une maladie chronique par l'OMS depuis 1997, définie comme "une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». Les études épidémiologiques indiquent qu'en 2015, environ 2,3 milliards d'adultes étaient en surpoids, dont plus de 700 millions d'obèses. Cette prévalence inquiétante s'accompagne en outre d'une mortalité importante : on attribue directement à l'obésité environ 3,5 million de décès par an au niveau mondial. Face ce contexte, l'armada thérapeutique s'avère relativement pauvre, et s'accompagne en outre de posologies contraignantes et d'effets secondaires non négligeables. Parmi les traitements autorisés sur le marché pour le traitement de l'obésité et du diabète de type 2 associé, le médicament X (nom sujet à confidentialité) présente ainsi l'inconvénient de devoir être administré par voie sous-cutanée, à des fréquences élevées compte tenu de sa demi-vie faible (2 administrations/jour). L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une

prestation contractuelle pour le compte d'un industriel pharmaceutique qui développe des composés thérapeutiques dans le domaine des troubles métaboliques. Cet industriel a notamment développé une nouvelle forme de galénique (matrice sous-cutanée) permettant une libération lente et prolongée du médicament X. En théorie, cette galénique devrait permettre d'améliorer l'efficacité du médicament X en augmentant sa biodisponibilité sur le long terme tout en diminuant l'amplitude de ses effets secondaires en évitant les effets de pics plasmatiques. Elle aurait ainsi l'avantage de permettre une réduction drastique des prises pour le patient (une administration par semaine) améliorant ainsi largement son confort de vie. Cependant, aucune étude préclinique d'efficacité n'a été conduite à ce jour sur cette nouvelle galénique du composé X afin de démontrer ce gain d'efficacité. Au total, 7 formulations à libération prolongée du médicament X différentes ont été développées et 3 d'entre elles seront sélectionnées pour les tests d'efficacité. Cette sélection sera réalisée en fonction des résultats d'un autre projet autorisé visant à déterminer les paramètres pharmacocinétiques des différentes formulations.

Le présent projet permettra d'étudier l'efficacité de ces 3 formulations du composé X sur un modèle rat d'obésité et de diabète et de comparer cette efficacité à celle du composé X dans sa forme galénique et sa posologie classiques. Les procédures du présent projet incluent des mesures régulières de prise alimentaire et de poids corporel, des mesures de composition corporelle par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN ; LF90II, Bruker), ainsi qu'un test de tolérance oral au glucose et un test de tolérance à l'insuline. Des prélèvements sanguins seront également pratiqués pour mesure de la glycémie et des taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c). Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de mieux sécuriser le développement de leurs formulations en permettant une sélection et une classification de ses leads sur des critères d'efficacité.

Pour cette étude, un total de 50 rats ZDF mâles sera nécessaire, séparé en 5 groupes expérimentaux de 10 animaux.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

Remplacer : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude préclinique d'efficacité d'un composé en développement sur l'obésité et le diabète.

Réduire Le nombre d'animaux utilisés par groupe a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour être en mesure d'obtenir des données significatives sur les paramètres pharmacodynamiques étudiés.

Raffiner : Le modèle animal qui sera utilisé est parfaitement caractérisé dans la littérature et très couramment utilisé dans les études pharmacocinétiques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Notamment, les volumes des prélèvements sanguins seront limités au strict nécessaire pour l'élaboration des dosages. Par ailleurs, les mesures de composition corporelle seront réalisées chez l'animal vigile grâce à la méthode RMN qui est très rapide (<2 minutes). Une attention particulière sera apportée aux conditions d'hébergement des rats ZDF compte tenu des particularités du modèle (polyurie et hyperdypsie). Ainsi, les cages et les biberons seront changés 3 fois par semaine afin d'assurer le confort d'hébergement. En outre, un enrichissement du milieu de vie sera assuré par l'ajout de petites briquettes en bois (SAFE) et de tubes cartons spécifiques pour rat (SAFE). Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites et des critères d'arrêt établis.

12738 De plus en plus de stratégies vaccinales sont basées sur l'emploi de vecteurs dérivés de virus comme les vecteurs lentiviraux ou adénoviraux. Ces vecteurs, amputés des séquences pathogènes pour l'homme, contiennent des séquences codant pour un antigène vaccinal. Les vecteurs lentiviraux peuvent infecter un large panel de types cellulaires et sont des vecteurs vaccinaux particulièrement efficaces pour l'induction de réponses immunitaires. Ces vecteurs induisent une présentation persistante de l'antigène qui pourrait expliquer cette meilleure réponse immunitaire. Ce n'est pas le cas des vecteurs dérivés de l'adénovirus humain dont l'infection résulte en une présentation transitoire de l'antigène probablement liée à la nature des cellules exprimant l'antigène.

Nous souhaitons confirmer cette hypothèse en réalisant une étude comparative des vecteurs lentiviraux et adénoviraux qui examinera d'une part le tropisme de ces vecteurs et d'autre part la durée de la présentation des antigènes par ces vecteurs. L'étude comparative de ces deux vecteurs nous permettra de mieux comprendre la pertinence de leur utilisation en tant que vecteurs vaccinaux. Nos expériences seront réalisées sur des souris adultes mâles et femelles pour lesquelles il existe de nombreux réactifs disponibles,

Une première procédure de sévérité modérée nous permettra de déterminer la dose de vecteur adénoviral à injecter qui permet d'obtenir une réponse immunitaire globale similaire à celle obtenue avec un vecteur lentiviral couramment utilisé dans le laboratoire et dont la réponse immunitaire est connue. Une deuxième procédure de sévérité légère visera à déterminer dans quels organes de l'organisme les deux vecteurs s'expriment et le temps nécessaire après l'injection pour que le pic maximal d'expression soit atteint. Deux autres procédures également de sévérité légère nous renseigneront sur l'implication des différentes populations cellulaires responsables de l'initiation de la réponse immunitaire, dans l'expression de l'antigène vaccinal au niveau des organes. Nous pourrons ainsi identifier les populations cellulaires qui expriment l'antigène vaccinal et déterminer si ces cellules ont été recrutées au niveau du site d'injection du vecteur ou si elles ont été infectées dans les organes suite à une migration du vecteur. Enfin, deux dernières procédures de sévérité modérée nous permettront de comparer l'efficacité vaccinale de ces vecteurs in vivo en utilisant un modèle de rejet de tumeurs.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Une compréhension du fonctionnement des vecteurs est déjà acquise et ils seront préalablement caractérisés in vitro avant l'emploi chez la souris. Pour reproduire ce qui se déroule chez l'homme lors de la vaccination et comprendre les mécanismes basés sur les interactions entre différentes cellules dans divers organes, cette étude doit être menée dans un organisme vivant.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit tout en conservant un minimum permettant d'obtenir des résultats interprétables. Grâce aux expériences menées antérieurement, nous avons déterminé la taille limite de nos groupes pour être statistiquement significatif tout en évitant la surutilisation d'animaux. Le nombre d'animaux à utiliser a été déterminé avec l'aide d'un biostatisticien et des tests statistiques de type ANOVA seront réalisés pour déterminer la significativité de nos résultats. Le nombre total de souris utilisées sera de 460 souris au maximum.

Raffiner : Les expériences seront réalisées par des expérimentateurs formés. Pour les procédures où des interventions sous anesthésie sont prévues, des soins particuliers seront apportés aux souris pour éviter toute douleur et inconfort. Aucun dommage pour les animaux n'est donc attendu après l'injection des vecteurs. Par contre, pour le modèle de rejet de tumeur, une grille d'évaluation de la douleur établissant des points limites sera établie et entraînera la mise à mort de la souris dès l'apparition des critères d'arrêt définis.

12739 L'hyperphagie - associée ou non aux dérèglements métaboliques- est généralement présente chez l'obèse, en particulier dans les phases de développement. Sous l'angle physiologique, sa mise en place résulte d'un désordre des signaux perçus par le système nerveux central. Parmi ces signaux, le glucose circulant est une information particulièrement importante de par la précision de sa régulation et sa rapidité d'action (quelques minutes). Ainsi, le glucose est une molécule prédictive en termes de signal de faim (initiation du repas) et de rassasiement (fin du repas) et agit sur le contrôle du métabolisme glucidique, en particulier sur l'axe hypothalamo-pancréatique en participant au contrôle nerveux de la sécrétion d'insuline. Ce projet vise à étudier si la détection centrale du glucose peut être modifiée par un régime riche en graisses et en sucrose (HFHS), et quels sont les acteurs moléculaires principaux qui sont impliqués dans cette dérégulation. Finalement, la part de ces acteurs à l'établissement du dérèglement de la prise alimentaire et du métabolisme sera mesurée.

Spécifiquement, le but du projet sera d'établir :

1) s'il existe un lien de cause à effet entre une dérégulation hypothalamique précoce de la détection hypothalamique du glucose, précédant la mise en place des désordres métaboliques et responsable des modifications de la sécrétion d'insuline chez l'animal sur régime HFHS.

2) les mécanismes mitochondriaux (cellulaires et moléculaires) sous-jacents à une perte de fonction hypothalamique au niveau des neurones hypothalamiques (participant à la commande vagale de l'axe hypothalamo-pancréatique, impliquée dans la sécrétion d'insuline).

Pour cela, la combinaison de stratégies d'expérimentation animale in vivo sera utilisée sur 576 rats sur une période de 2 ans.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'étude de métabolisme énergétique et plus particulièrement de l'axe hypothalamo-pancréatique ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles in vitro.

Réduire : Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre plusieurs groupes.

Raffiner : Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux (habituation, utilisation d'anesthésique et antalgique). Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12740 En raison de ses propriétés physiques et métaboliques, la barrière hémato-encéphalique (BHE) restreint les échanges entre le compartiment sanguin et le compartiment cérébral permettant ainsi le maintien de l'homéostasie au niveau du système nerveux central.

Des découvertes récentes dans les domaines de la biologie cellulaire et moléculaire ont permis de préciser nos connaissances concernant la perméabilité de la BHE et sa régulation. On reconnaît depuis quelques années qu'une dérégulation de ses mécanismes de transport peut participer au dysfonctionnement cérébral. Ainsi, la BHE fait l'objet de nombreuses études dans le cadre de certaines pathologies cérébrales comme la Maladie d'Alzheimer, mais aussi dans le cadre de traumatismes crâniens.

Notre projet de formation est d'introduire les jeunes chercheurs émergents aux dernières techniques de détection du réseau neuro-vasculaire par l'IRM fonctionnelle. Ce projet étudiera les interactions vasculaires et neuronales au niveau du cortex sur les modèles de traumatismes crâniens sur souris anesthésiées.

Dans ce projet nous respecterons les 3R :

Remplacer : Pour comprendre la relation entre l'activité neuronale et l'hémodynamisme dans le cerveau, il est nécessaire de générer des données biologiques pertinentes. L'utilisation d'animaux est donc inévitable. Les souris sont les modèles animaux de prédilection pour les recherches dans ce domaine en raison des nombreuses précédentes données obtenues sur les modèles de neuroinflammation. Le lien entre le système neuronal et la BHE ne peut être étudié avec des modèles in vitro de cellules en culture, nous ne pouvons donc pas remplacer ce modèle animal.

Réduire : L'expertise de nos instructeurs depuis 15 ans sur ces modèles garantit que le nombre d'animaux utilisés est minimisé par une pratique toujours de haute qualité dès le départ. De même il est extrêmement important pour nos objectifs éducatifs de pouvoir démontrer et mettre en pratique les actes de préparation chirurgicaux, le nombre d'animaux sera donc adapté en conséquence. 20 souris par an soit 100 souris au total seront utilisées dans ce projet. Il nous est nécessaire de démontrer les techniques puis de les faire pratiquer par les étudiants, nous ne pouvons donc pas travailler avec moins d'animaux ;

Raffiner : les méthodologies utilisées dans ce projet impliquent la mise en œuvre de toutes les stratégies expérimentales et pharmacologiques disponibles actuellement pour réduire le nombre d'animaux utilisés mais aussi minimiser les possibles effets délétères pour ceux-ci. Ainsi, nos mesures mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales impliquent une induction et suivi de l'anesthésie, une mise en place d'analgésie en pré et post-opération, une installation tout au long des procédures chirurgicales de contrôle de la température par tapis

chauffant, avec un respect particulier de la notion de points limites adaptés à chaque procédure (critères d'interruption en cas de souffrance des animaux). Les animaux seront hébergés en groupe dans un environnement enrichi de maisons en carton ou de carrés de cellulose avec lesquels ils peuvent construire des nids.

12741 Ce projet porte sur une nouvelle approche thérapeutique potentielle du cancer du pancréas, dont l'incidence est en augmentation constante sur les 30 dernières années et représente un des plus grands challenges de l'oncologie digestive pour les années à venir. L'incidence annuelle du cancer du pancréas est passée de 4,9 à 9,9/100.000 habitants chez les hommes, et de 2,2 à 6/100.000 habitants chez les femmes en France entre 1980 et 2012. Seuls 20% des patients atteints pourront bénéficier d'une prise en charge chirurgicale potentiellement curatrice. La survie globale est inférieure à 5% à 5 ans, elle est de l'ordre de 20% lorsqu'une résection chirurgicale (associée ou non à une chimiothérapie adjuvante) est réalisée. Cette prise en charge chirurgicale est complexe avec une mortalité péri-opératoire dans 5% des cas et une morbidité de 50% (avec comme principales complications : fistule, abcès, diabète, gastroparésie).

L'objectif est de cerner l'utilité thérapeutique des effets d'impulsions de champ électrique nanoseconde dans le traitement de ces cancers du pancréas. En effet, ces impulsions très courtes à hautes amplitudes sont déjà connues pour affecter et éradiquer un certain nombre de cancers superficiels (par exemple, de la peau), et elles ont l'avantage d'être sans douleur, sans effets secondaires connus et de cibler précisément les tissus. Elles sont actuellement en test clinique aux EU et en Europe dans des thérapies pour soigner le mélanome humain, et des études précliniques débutent sur le carcinome hépatocellulaire.

A ce jour, seules 2 études in vivo d'utilisation des nanopulses dans le cancer du pancréas sont publiées, montrant des effets bénéfiques en terme de survie et de diminution du volume tumoral. Notre but est de déterminer si les impulsions de champ électrique nanoseconde peuvent avoir un effet synergique en association avec de la chimiothérapie par gemcitabine. En effet, plusieurs études in vivo suggèrent un effet synergique des nanopulses et de la chimiothérapie dans les cancers du sein et ORL, mais aucune étude ne rapporte l'association de ces 2 approches, in vitro ou in vivo, dans les cellules cancéreuses pancréatiques.

Il est primordial de vérifier dans un premier temps que ces impulsions n'affectent pas les tissus sains ni les vaisseaux sanguins, ce qui implique un passage expérimental du modèle cellulaire in vitro déjà développé dans notre laboratoire au modèle animal in vivo.

Nous prévoyons d'utiliser des technologies d'imagerie de pointe (bioluminescence, fluorescence en microscopie multiphotonique) afin de suivre l'influence de ces impulsions de champs électrique sur des tumeurs murines in vivo. Ainsi nous étudierons les modifications du micro-environnement tumoral, la dosimétrie, la nécrose, la mort tumorale, la taille et la vascularisation des échantillons en réponse aux traitements.

Ce projet expérimental utilise au total 66 souris et répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacer : les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier face à l'administration de thérapeutiques. Ils sont aussi insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Les modèles murins de cancer du pancréas sont bien décrits et permettent de mimer le phénomène observé chez l'Homme.

Réduire : le modèle de cancer du pancréas est maîtrisé par l'équipe et le porteur de ce projet, ce qui permet de limiter des étapes de mises au point, déjà réalisées par le passé dans des laboratoires de renom. De plus, des expériences in vitro ont déjà permis de définir les valeurs seuil et dose-réponse de la thérapie électrique sur les cellules de cancer du pancréas murines. Celles in vivo sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée pour ces études précliniques.

Nous avons déjà réalisé des études préliminaires par des techniques de culture cellulaire 2D in vitro de façon à limiter le nombre d'animaux et à remplacer au maximum les modèles. Il s'avère cependant nécessaire dans cette étude d'utiliser 40 jeunes souris divisées en différents sous-groupes expérimentaux. La technique de microscopie envisagée permet le suivi de l'animal vivant,

évitant son euthanasie pour l'observation de la tumeur. Les animaux en fin d'étude seront euthanasiés et le matériel biologique servira soit à des études de biologie moléculaire *in vitro*, soit à de l'histologie.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, tapis chauffant pendant la chirurgie, analgésique post opératoire). Des points limites précoces sont définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12742 Le cancer de la vessie est un des cancers les plus fréquents au monde avec 435 000 nouveaux cas chaque année et 165 000 décès par an. Au diagnostic, 70-80% des cancers de la vessie sont des tumeurs superficielles n'infiltrant pas le muscle vésical (TVNIM). Environ 25% des patients est diagnostiqué d'emblée avec une tumeur profonde infiltrant le muscle vésical (TVIM).

Depuis près de 40 ans, le bacille de Calmette-Guérin (BCG), utilisé comme vaccin anti-tuberculeux, est aussi le traitement de référence des tumeurs superficielles de la vessie (TVNIM) à haut risque de progression. Il est utilisé en instillations intra-vésicales après la résection complète de la tumeur. Son mécanisme d'action est complexe et partiellement élucidé. Malgré un traitement bien conduit, le risque de récurrence est de 50%, et le risque progression vers une tumeur infiltrant le muscle est estimé entre 20% et 30% dans les 5 ans. Dans ce dernier cas, la préservation de l'organe n'est pas possible, et l'exérèse chirurgicale complète de la vessie est indiquée. Entre 10% et 15% des patients développe finalement des métastases et décède de leur maladie initiale. Aujourd'hui, aucun élément clinique ni biologique ne permet de prédire la réponse au BCG, ni même l'évolution métastatique de la maladie. In fine, les mécanismes d'échappement au BCG sont mal connus les mécanismes de résistance des cellules tumorales à l'immunothérapie par BCG ont été étudié afin d'apporter un rationnel scientifique au développement de médicaments innovants chez les patients non répondeurs au BCG.

Afin d'adapter le traitement des patients atteints d'un cancer de la vessie il est indispensable de pouvoir identifier les phénomènes de résistance et l'influence des modifications induites dans le système immunitaire par le traitement au BCG.

Les résultats préliminaires de nos différents modèles *in vitro* (lignées humaines et tumeurs fraîches de cancer de la vessie) ont montré que le BCG induit des modifications susceptibles d'accroître l'agressivité tumorale de certaines cellules. Plusieurs modèles de résistance au BCG ont été choisis pour cette étude : modèles *in vitro*, « *in vitro* » (*in situ* + *in vitro*) et *in situ*. L'objectif du modèle murin sera de valider *in vivo* la capacité d'invasion métastatique acquise après exposition au BCG. In fine, cette étude pourrait permettre éventuellement d'identifier précocement des patients à haut-risque métastatique en cas de non-réponse au BCG. Afin de valider notre hypothèse scientifique, nous nous proposons de comparer l'évolution de la tumeur en fonction des modifications cellulaires induites par le traitement au BCG.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer Le développement tumoral, et notamment les phénomènes métastatiques implique une interaction forte entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, notamment les processus angiogéniques et immunitaires. Actuellement, malgré les modèles *in vitro* de plus en plus complexes, il n'est pas possible de reproduire les différents processus physiopathologiques du développement d'un cancer. Ainsi, le modèle animal reste indispensable pour valider nos résultats préliminaires *in vitro/in situ/in vitro* et notre hypothèse scientifique.

Réduire : Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à une étude statistique permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus. Les techniques de greffe ont été standardisées pour améliorer la reproductibilité des résultats.

Raffiner : Ainsi, ce projet nécessitera un nombre de 45 souris. De manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire et d'éviter toute forme de souffrance à l'aide de complément alimentaire et de traitements anti douleur adaptés. Toutes les interventions et administrations se feront sous anesthésie générale ou locale. Les points limites établis seront strictement appliqués.

L'hébergement des animaux se fera dans des conditions optimales avec enrichissement du milieu et un suivi quotidien des effets et contraintes liés aux procédures.

12743 Durant des décennies, l'espace extracellulaire (ECS), espace entre les cellules cérébrales, a très peu été étudié principalement à cause de la difficulté à l'observer. En effet, la seule technique capable de le visualiser était la microscopie électronique qui, du fait de la fixation chimique et de la déshydratation des tissus, réduit presque intégralement le volume de l'ECS. Si les techniques récentes de cryofixation permettent de préserver localement l'ECS dans certaines régions du cerveau, elles ne permettent pas d'étudier les changements dynamiques de l'ECS dans les tissus vivants.

En plus d'être le siège d'interactions cellule-cellule, l'ECS joue également un rôle important dans des fonctions neuronales cruciales, telle que la formation de circuits neuronaux. En effet, l'ECS fournit un réservoir pour les ions impliqués dans l'activité électrique des neurones et joue un rôle clé dans la transmission de substances neuro-actives entre les cellules. Il a été montré que sa structure et ses propriétés de diffusion sont très hétérogènes et qu'elles dépendent de conditions internes et externes, telles que le système de sommeil/éveil ou de modifications pathologiques.

Ce projet vise à mieux comprendre le rôle de l'ECS en étudiant sa dynamique et sa structure dans les conditions basales dans le cerveau. Pour cela, nous développerons chez la souris, une approche optique permettant de visualiser l'ECS in vivo, au travers d'une fenêtre crânienne. En particulier, nous utiliserons la technique de Shadow Imaging (SUSHI) basée sur la microscopie de super-résolution. Cette procédure vise à injecter localement un fluorophore (agent de contraste) dans l'ECS pour imager différentes régions du cerveau, notamment l'hippocampe et le cortex. Cette approche permet non seulement d'imager le milieu extracellulaire mais fournit aussi une image inversée (shadow) des cellules (le fluorophore ne pénétrant pas les cellules, celles-ci apparaissent noires dans l'image).

Pour ce faire, nous allons :

- 1) Faire la preuve de la faisabilité du SUSHI in vivo
- 2) Optimiser la technique d'injection du fluorophore (agent de contraste)
- 3) Caractériser l'évolution de l'ECS au cours du temps en réalisant de l'imagerie SUSHI chronique in vivo.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer L'objectif de ce projet étant de caractériser l'ECS en quantifiant notamment le volume du milieu extracellulaire dans les conditions les plus physiologiques possibles, cette étude ne peut être réalisée de manière pertinente avec des modèles in silico ou in vitro.

Réduire : Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, les étapes de validation du microscope pour l'imagerie SUSHI seront faites d'abord avec des tranches organotypiques, puis sur des tranches aigües d'hippocampe. En préparant plusieurs échantillons à partir d'un même animal, ceci permettra d'optimiser les conditions d'imagerie qui seront utilisées à terme in vivo. Au total 140 souris seront nécessaires pour mener à bien cette étude.

Raffiner Pour les deux dernières parties, l'anesthésie pour les chirurgies et les séances d'imagerie seront faites avec les molécules les plus adaptées aux procédures de même que la gestion de la douleur post-opératoire par injection d'analgésiques. Le confort de l'animal sera pris en compte avec le plus grand soin.

12744 La myopathie à némaline (NM), aussi appelée myopathie à bâtonnets, est une maladie héréditaire touchant les muscles avec une sévérité variable. Cette pathologie, qui touche 1 personne sur 50

000, ne bénéficie à l'heure actuelle d'aucun traitement et se traduit dans la majorité des cas par un décès à un âge précoce. Cette pathologie est due à des mutations localisées dans une dizaine de gènes. Dans 50% des cas les plus sévères, elle est causée par des mutations dominantes dans le gène ACTA1, qui code pour l'alpha actine squelettique. L' α -actine squelettique est la forme de l'actine présente dans les muscles squelettiques. Elle forme les filaments fin d'actine qui sont un des éléments les plus abondants de la cellule. L'actine et ces protéines associées permettent le maintien de la structure de la fibre musculaire. Dans le cas de la myopathie à némaline, les mutations du gène ACTA1 sont dominantes, c'est-à-dire que l'on retrouve dans la cellule la protéine sous sa forme mutée (50%) mais aussi non mutée (50%). La protéine mutée est non fonctionnelle et ne permet pas la formation des filaments fin d'actine. La protéine se retrouve alors dans des agrégats dans les cellules musculaires ainsi que ces protéines partenaires. La cellule musculaire ne fonctionne donc plus normalement, la capacité de contraction des muscles est diminuée.

Dans notre laboratoire, nous étudions un modèle de souris reproduisant la maladie et ayant une mutation dans le gène ACTA1 responsable de la pathologie chez l'Homme. Au cours de nos récentes découvertes, nous avons identifié une nouvelle piste thérapeutique qui porte sur un mécanisme physiopathologique encore inexploré dans le contexte de la myopathie à némaline. Nous avons identifié une altération au niveau des structures responsables du transfert de l'information nerveuse jusqu'au muscle. Nous avons pour but de cibler spécifiquement ces structures altérées à l'aide d'une molécule pharmacologique pour espérer observer un effet thérapeutique bénéfique. Cette molécule a déjà montré son efficacité dans des pathologies ayant le même mécanisme physiopathologique et est actuellement utilisée comme médicament pour des patients atteints d'autres myopathies.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : A ce jour, il n'existe pas de modèle cellulaire de la maladie (les cellules en culture ne survivent pas). A l'inverse, les modèles murins de la maladie reproduisent bien les aspects cliniques de la maladie humaine (faiblesse musculaire, présence d'agrégats protéiques dans les fibres musculaires, réduction de l'espérance de vie, altération du mécanisme physiopathologique ciblé). Afin de vérifier l'efficacité de nos molécules, il est important d'utiliser un organisme entier chez lequel nous pourrions mesurer l'effet au niveau de l'organe cible (les muscles) et mesurer l'effet de notre molécule sur la force musculaire. Il n'y a pas de remplacement possible.

Réduire : Le nombre de souris nécessaire a été estimé à 12 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes). Les souris seront élevées et reproduites dans notre établissement utilisateur. La durée du projet sera de 2 ans et il nécessitera l'utilisation totale de 48 souris.

Raffiner : Lors de la réalisation de l'analyse fonctionnelle des muscles, l'animal recevra une injection d'analgésique de type morphinique ce qui permettra de soulager les douleurs intenses éventuelles. L'animal sera également disposé sur un tapis chauffant tout au long de l'anesthésie lors des mesures de forces musculaires. Par ailleurs, un aliment spécifique hydratant et appétant sera placé au sol dans la cage afin de faciliter l'accès aux souris malades qui présentent un défaut de motricité. Par ailleurs, les infections oculaires qui peuvent accompagner la maladie seront traitées avec une pommade oculaire d'antibiotiques. Pour l'injection biquotidienne de la molécule pharmacologique, des mesures de raffinement seront également appliquées comme le massage du site d'injection, l'injection du produit à température corporelle, le changement d'aiguille entre chaque injection, l'application d'un anesthésique/analgésique local au point d'injection et le changement des points d'injections (une fois à gauche, une fois à droite, ...).

La molécule pharmacologique apportée ne devrait pas entraîner d'effets secondaires chez les souris traitées. En effet, elles sont déjà utilisées en clinique et ont également été testées chez des souris. Les doses administrées lors de ce projet ne devrait pas induire des dommages supplémentaires aux souris modèles car nous avons sélectionné la dose en fonction des résultats obtenus dans plusieurs articles scientifiques. Un bénéfice thérapeutique est au contraire attendu : il devrait être plus ou moins important en fonction de l'efficacité des molécules.

12745 La trisomie 21 (T21) est l'anomalie chromosomique la plus fréquente chez l'homme. Cette erreur de réparation du patrimoine génétique conduit à une surexpression des gènes du chromosome 21 humain (Hsa21), perturbant de nombreux systèmes physiologiques, morphologiques et biochimiques. Ces dérégulations se font de manière directe via l'augmentation de la production de protéines du Hsa21, ou indirecte à travers une multitude d'interactions de ces protéines sur l'ensemble du génome. Des modèles souris ont été générés dans le but d'étudier le rôle des différentes régions du Hsa21 impliquées dans les différents symptômes des personnes porteuses de la trisomie 21. Ils présentent des altérations de mémoire dans des tests de performance cognitive.

Parmi les gènes candidats à ces déficits, nous avons démontré que le surdosage du gène codant pour la protéine Cystathionine Beta Synthase (CBS) était impliqué dans la fonction de mémoire à court terme, déficitaire dans un premier modèle de la trisomie. Dans un second modèle surexprimant seulement le gène de la CBS, les mêmes déficits de mémoire et d'apprentissage sont observés, confortant l'hypothèse du rôle du surdosage de la CBS dans ce déficit de mémoire des modèles de la T21.

Le but de notre étude est de tester une molécule qui est capable chez la levure de réduire les conséquences du surdosage de la CBS. Nous voulons tester cette molécule maintenant dans les 2 modèles des souris de T21. Nous souhaitons voir comment, un traitement chronique avec cette molécule pourrait restaurer les performances des souris possédant 3 copies du gène Cbs. Cette molécule est déjà sur le marché et est préconisée dans le traitement de pathologies du cerveau.

Respect de la règle des 3R :

REPLACER : Des études ont été réalisées au préalable in vitro sur des levures. A ce stade, il nous est nécessaire de travailler sur un animal. En effet, nous ne pouvons pas remplacer l'utilisation de modèle animal car il est nécessaire d'utiliser une espèce dotée d'un pouvoir de mémorisation cognitive dans notre projet.

REDUCTION : Nous testerons cette molécule sur 2 lignées de souris référencées dans l'étude de la T21 ; nous utiliserons 2 cohortes de 75 animaux réparties en 5 lots, pour chaque lignée de souris. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, la 2e cohorte d'animaux transgéniques ne sera générée que si la 1ere cohorte démontre une activité de mémorisation au cours des tests d'évaluation. Nous générerons donc potentiellement 300 animaux afin de couvrir l'ensemble de l'étude avec les 2 modèles.

RAFFINER : Aucun dommage particulier n'est attendu pour ce projet. Néanmoins, les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien et des points limites éthiques et des critères d'arrêt seront appliqués afin d'éviter tout stress ou souffrance

12746 Le syndrome du côlon irritable est le problème le plus courant en gastroentérologie, affectant 20% de la population dans certains pays. C'est la première cause de consultation chez le gastroentérologue. Les troubles de la motilité, l'altération de la muqueuse, du système immunitaire, du microbiote et du système nerveux central en plus de l'hypersensibilité viscérale sont les principaux symptômes de cette pathologie. Parmi tous ces symptômes, l'hypersensibilité viscérale est le plus difficile à traiter et aujourd'hui, il n'existe pas de traitement efficace pour cela. D'autres maladies gastro-intestinales, telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou la maladie cœliaque sont également associées à une hypersensibilité viscérale. Dans ces pathologies, l'hypersensibilité viscérale n'est pas traitée. Tous les traitements se concentrent à diminuer les problèmes immunitaires associés à ces maladies. La caractéristique de l'hypersensibilité viscérale chez les patients est une réduction du seuil de douleur en réponse au passage intraluminal de matière fécale dans le côlon. Cette distension du colorectum est habituellement non perçue chez les individus sains.

Le moyen le plus fiable de reproduire l'hypersensibilité viscérale chez l'animal, est d'induire une réponse inflammatoire, connue pour provoquer une allodynie (diminution du seuil douloureux) et une hyperalgésie, deux composantes de l'hypersensibilité viscérale. En effet, l'administration intracolique de TNBS dans le côlon proximal des rats induit une inflammation associée à l'allodynie

et l'hyperalgésie viscérale. La distension coloréctale est une méthode acceptée et reproductible pour évaluer la sensibilité viscérale que ce soit pour les études cliniques ou précliniques. La distension du côlon reflète ce qui se passe chez l'humain au niveau de l'intensité et de la localisation de la douleur chez les patients. La distension colorectale implique l'inflation contrôlée d'un ballon dans l'intestin à des pressions connues. Elle produit des contractions des muscles abdominaux appelées réponse viscéromotrice et les changements de la pression intraluminaire colique durant l'inflation intracolique du ballon sont étroitement liés à la présence de contractions musculaires abdominales.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques dans un modèle d'hypersensibilité viscérale induit par le TNBS chez le rat.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Les méthodes alternatives, permettant une évaluation nociceptive viscérale, sont inexistantes. Ainsi, ces limitations rendent incontournables le recours à l'expérimentation animale afin de valider de nouveaux candidats médicaments pour le traitement des douleurs viscérales.

Réduire : Afin de répondre à cet objectif, le nombre d'animaux utilisés sera de 1270 rats à raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. La distension colorectale permettra d'évaluer au cours du temps, sur un même animal, la réponse nociceptive (variation de la pression intraluminaire colique). Elle sera réalisée une fois avant (basale) puis 7 jours après l'induction de l'inflammation. Ceci permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés puisque chaque rat sera son propre contrôle.

Raffiner : Le TNBS sera administré dans la paroi du colon sous anesthésie chimique. Après l'opération, les rats seront remis dans leur cage d'hébergement et surveillés jusqu'à leur réveil. Un ballon de distension est fixé autour d'un capteur et d'un cathéter relié à un barostat (permettant l'application de pressions connues). Le ballon préalablement lubrifié est introduit dans le colon des animaux (maintenus dans une cage de contention de diamètre 7 cm) et le cathéter est scotché à la queue. Les rats seront anesthésiés à l'isoflurane au moment de l'introduction du ballon de distension.

Un enrichissement adapté à l'espèce sera rajouté aux animaux. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12747 Les tumeurs hypophysaires ont une incidence élevée (1 personne/1500). Ces tumeurs bien que bénignes provoquent des maux de tête, des troubles visuels et peuvent être invasives et agressives dans certains cas. Elles répondent très mal aux traitements thérapeutiques classiques et il est donc indispensable de trouver de nouvelles molécules pouvant limiter leur développement. Elles restent encore complexes à étudier car très hétérogènes selon leur fonctionnalité et les hormones qu'elles produisent. Paradoxalement, bien que ces lésions soient très fréquentes chez l'homme, nous ne disposons pas d'outils d'étude pour caractériser leur comportement, identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et tester de nouveaux traitements cliniques. Leur étude est donc tributaire de modèles précliniques qui soient représentatifs et faciles d'utilisation. Bien que l'accès à la tumeur reste délicat, nous avons accès à de nombreux prélèvements chirurgicaux qui n'ont jusqu'à présent pas permis d'établir de modèles cellulaires d'études. C'est dans ce contexte que notre projet vise à développer de nouveaux modèles de greffe de tumeurs de patient afin de pouvoir établir des modèles expérimentaux plus proches du patient, d'étudier la contribution de certaines composantes du système immunitaire et de dériver des outils cellulaires qui devraient réduire nos besoins en expérimentation animale. La disponibilité de résections des différents sous-type de tumeurs que nous souhaitons étudier est difficilement prévisible, la réalisation de la totalité de notre projet devrait s'étendre sur 5 ans, il nécessitera un maximum de 766 souris. Ces animaux recevront des cellules tumorales issues de patients par injection ou greffe sous cutanée après une légère incision sous anesthésie afin dans assurer leur maintien sur des périodes de 4 mois maximum. Les animaux greffés permettront non seulement le maintien et l'amplification des lésions tumorales de patients,

mais également de mieux comprendre comment certaines cellules du système immunitaire appelées macrophages contribuent à la tumorigénèse.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Une stratégie de remplacement à l'usage d'animaux sera également développée, lors de chaque réimplantation tumorale des essais de mise en culture des tumeurs seront réalisés pour établir des lignées cellulaires afin de raffiner nos travaux et réduire l'utilisation à venir d'animaux pour nos futures études.

Réduire : Il est important de noter que pour chaque expérience, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum pour laisser espérer l'obtention des modèles que nous souhaitons développer. Ce nombre bien que réduit à son maximum ne mettra pas en péril la production de matériel biologique et l'obtention de conclusions interprétables qui conduiront à ne pas répéter inutilement les d'expériences que nous mettons en place sur les animaux.

Raffiner Les animaux ne subiront pas de geste invasif lourd, excepté une injection ou légère incision sous anesthésie permettant la greffe des cellules dérivées de tumeurs de patients. Afin de maximiser l'obtention de données scientifiques et raffiner nos approches expérimentales, nous établirons une fiche individuelle de traçabilité et de suivi pour chaque souris greffée afin de les suivre attentivement et d'éviter l'apparition de tout signe de souffrance inutile et non bénéfique à l'obtention de données scientifiques de qualité. L'utilisation d'anesthésiques devrait limiter le stress des animaux lors des manipulations d'injection des greffons de tumeurs, et que nous mettrons en place pour chaque animal une surveillance adaptée basée sur un examen rigoureux de leur comportement, de leur aspect, de l'évolution de leur poids et du volume des tumeurs implantées afin de limiter au maximum la souffrance des animaux auxquels nous sommes contraints d'avoir recours pour apporter un bénéfice clinique au nombreux patients souffrant de tumeurs hypophysaires.

12748 Les obstructions des artères coronaires sont une cause majeure de dysfonction cardiaque, menant à des remodelages structurels qui aboutissent à un arrêt cardiaque. Les maladies cardiaques sont dans les nations industrialisées, une étiologie prédominante d'invalidité et de mortalité aussi bien chez l'homme que chez la femme. Le poids du cœur normal varie en fonction de la masse corporelle. L'augmentation de la taille et du poids du cœur accompagne beaucoup de formes de maladies cardiaques et porte le nom d'hypertrophie. La dilatation consiste en une augmentation de la taille d'une cavité cardiaque. Plus spécifiquement, l'insuffisance cardiaque (IC) résulte d'un déséquilibre entre la perfusion et les véritables besoins du cœur en sang oxygéné. Le tissu cardiaque souffre non seulement suite à l'insuffisance en oxygène mais également par la réduction des substrats et une accumulation des métabolites. Dans 90% des cas, la cause de l'insuffisance myocardique est due à une réduction du flux sanguin coronaire suite à l'obstruction d'une artère coronaire par une plaque d'athérosclérose. L'infarctus du myocarde (IM) est la forme la plus importante d'IC dans laquelle la durée et la sévérité de l'ischémie (diminution de la vascularisation artérielle, donc de l'apport sanguin) sont suffisantes pour induire la mort du muscle cardiaque. L'occlusion d'une artère coronaire majeure résulte en l'ischémie et la mort cellulaire potentielle dans la zone anatomique du cœur irriguée par cette artère, appelée région à risque. Le remodelage ventriculaire est le processus qui survient suite à un IM aigu. Il englobe, d'une part, la perte de cardiomyocytes par apoptose et nécrose aboutissant à l'espacement des cellules contractiles, et d'autre part, l'amincissement de la paroi du ventricule gauche (VG), mais aussi la dilatation du VG ainsi que l'accumulation de collagène. Ces altérations architecturales complexes surviennent non seulement dans la zone infarctée mais également dans le tissu cardiaque sain après un IM. En effet, des effets compensatoires par hypertrophie, dilatation et hyper kinésie des territoires non ischémiques apparaissent. Bien que ce remodelage cardiaque soit initialement une réponse adaptative, il conduit progressivement à une dilatation menant à une insuffisance cardiaque par congestion.

Des modèles animaux d'IC existent et consistent en une ligature d'une artère coronaire suivie ou non d'une re-perfusion. D'un point de vue anatomique, l'artère coronaire du cœur murin présente davantage de collatérales que celle de l'être humain, ce qui permet de bien cibler la zone à risque

en fonction de l'endroit de l'occlusion. Des dosages de biomarqueurs circulant et cytokines chez la souris aideront aux diagnostics et valideront la réussite du modèle.

Nous avons mis en place ultérieurement ce modèle avec quelques succès à savoir la chirurgie, le suivie échocardiographies et le dosage de biomarqueurs. Nous souhaitons actuellement améliorer le test de mesures de pression invasive et le test d'effort qui n'ont pas donné des résultats satisfaisants et avoir de la micro tomographie (μ CT) comme nouvel outil d'imagerie.

Par conséquent, nous établissons, un modèle minimalement invasif et simple, d'infarctus du myocarde chez la souris par ligature de l'artère coronaire descendante gauche. Ensuite, nous validerons ce modèle par un test d'effort et de mesure de pression intraventriculaire et nous dosons les biomarqueurs et les cytokines circulant suite à l'ischémie, on finira par faire de la micro-tomographie pour voir le tissu cardiaque et les vaisseaux autour.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Pour réaliser ce projet, on ne peut pas remplacer le modèle animal vivant comme la souris à cause de son système circulatoire proche de l'humain et surtout assurer l'information scientifique nécessaire au développement de stratégies thérapeutiques pour les maladies cardiovasculaires.

Réduire : Dans ce protocole, nous souhaiterons utiliser au total 48 animaux. Ces animaux seront répartis en 2 groupes (24 souris contrôles et 24 souris opérées), dans chaque groupe nous utilisons 12 souris mâles et 12 souris femelles. Ce nombre est le minimum requis pour des résultats statistiquement relevant.

Raffiner : Toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale. Une attention particulière est mise sur la gestion de la douleur post-opératoire faisant suite à la chirurgie induisant le modèle d'infarctus. Ainsi des antidouleurs de la famille des opiacées et des anti-inflammatoires seront utilisés afin d'éviter toute douleur chez nos animaux. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12749 L'atrophie multisystématisée (AMS) est une maladie neurodégénérative débutant à l'âge adulte et d'étiologie inconnue touchant plus de 3000 personnes en France. L'AMS se traduit par un syndrome parkinsonien (lenteur, rigidité, tremblement), une ataxie (déséquilibre, maladresse), des problèmes de régulation de la pression sanguine ou du système urinaire et génital. N'importe quelle combinaison de ces symptômes est possible. L'espérance de vie moyenne après la déclaration de l'AMS est inférieure à 9 ans et il n'existe à l'heure actuelle, aucun traitement disponible pour atténuer la sévérité des symptômes ou la progression de cette maladie dévastatrice.

Au niveau cellulaire, l'AMS se caractérise par la présence d'une protéine toxique, caractéristiques des maladies neurodégénératives appelée l'alpha-synucléine (SYN) dans certains types de neurones. Selon plusieurs données expérimentales, l'agrégation de la SYN serait à l'origine des déficits moteurs et du processus neurodégénératif.

Du fait de la gravité, de la rapidité et de la généralisation du processus neurodégénératif, le développement de traitements neuroprotecteurs capables de ralentir l'évolution de la maladie constitue un besoin urgent.

Le but de ce projet est d'évaluer le potentiel thérapeutique d'un nouveau traitement administré sur une lignée murine, appelée PIPSyn qui surexprime la SYN. Si cette lignée n'a pas de phénotype nocif pouvant altérer sa qualité de vie, elle montre néanmoins un léger déficit moteur, détectable au court de tests comportementaux qui analysent une motricité fine. Notre déroulé expérimental sera une administration des molécules par gavage durant 4 mois ou 6 mois (en fonction des résultats expérimentaux), suivi d'un test comportemental faisant appel au comportement moteur spontané de l'animal sans contention pour mesurer l'effet de ces molécules sur la motricité des animaux. Le cerveau sera ensuite prélevé pour des analyses histologiques.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Pour ce projet, il n'existe pas de méthodes de substitution ou alternatives, puisque l'efficacité du traitement nécessite l'utilisation de test de comportement moteur dans un modèle de souris transgénique vivant.

Réduire : une analyse de puissance a été effectuée, permettant de réduire le nombre à 200 souris incluant les groupes expérimentaux (3 doses différentes de composé) et leur contrôle.

Raffiner : Les procédures prévues sont légères, nous avons vérifié par ailleurs qu'aucune donnée actuelle n'indique que les molécules testées soient susceptibles d'entraîner une souffrance chez les animaux. Les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures, soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement. Des points limites suffisamment précoces et des critères d'arrêt seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, un réchauffement, une nourriture adaptée et des traitements vétérinaires si nécessaire.

12750 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par une inflammation de la muqueuse intestinale provoquant des douleurs abdominales, des diarrhées, et une atteinte de la région anale (fissure, abcès). Ces symptômes s'accompagnent souvent de fatigue, d'anorexie et de fièvre, voire de manifestations extra-intestinales (articulaires, cutanées, oculaires, hépatiques) et peuvent provoquer un isolement social.

Plusieurs traitements contre les MICI sont actuellement utilisés. Les anti-inflammatoires comme les 5-ASA ou les corticoïdes et des traitements immunomodulateurs (les biothérapies) permettent de contrôler les crises et d'éviter l'apparition de nouvelles lésions. Cependant, il n'existe aucun traitement curatif et des résistances ainsi que des échappements thérapeutiques sont toujours rapportés. Ainsi, il y a une nécessité de trouver de nouveaux traitements. Des études montrent que le récepteur CC chemokine receptor (CCR-3) et certains de ses activateurs (CCL-7) sont davantage exprimés dans le colon des patients atteints de colite.

Ce récepteur participe au recrutement et à l'activation des cellules immunitaires sur le site de l'inflammation. Il est exprimé à la surface de nombreuses cellules appartenant au système immunitaire inné (éosinophiles, basophiles) mais également au système immunitaire acquis (lymphocytes de type Th2). Ces cellules sont impliquées dans les MICI. En effet, les éosinophiles et les lymphocytes Th2 contribuent à l'établissement et au maintien de l'inflammation intestinale des patients MICI. Ainsi, cette étude a pour objectif d'évaluer l'implication du récepteur CCR-3 dans un modèle de colite induite au sulfate de dextran (DSS). La colite sera induite chez des souris déficientes pour le récepteur CCR-3 et des souris sauvages ayant reçu ou non un inhibiteur pharmacologique de CCR-3.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'inflammation intestinale est un système complexe faisant intervenir des acteurs cellulaires présents dans l'ensemble de l'organisme, notamment au niveau des ganglions, de la rate et du thymus, qui nous contraint à utiliser l'organisme entier comme la souris.

Réduire : Au total 40 animaux seront concernés par cette étude répartis en 5 groupes de 8 souris (souris sauvages témoins sans colite, souris CCR-3 déficientes témoins sans colite, souris sauvages témoins avec colite, souris sauvages avec colite et inhibiteur pharmacologique de CCR3, souris CCR-3 déficientes avec colite). Ce nombre permettra d'obtenir des résultats statistiquement fiables.

Raffiner Quotidiennement les paramètres cliniques (poids, score de sévérité de la colite) seront suivis afin de déterminer la sévérité de la maladie. La sévérité de la colite est déterminée par calcul d'un score clinique qui permet de connaître un point limite. Ce score se calcule grâce à la perte de poids des souris et à une analyse des selles. Le score maximal par animal est de 8, les animaux trop sévèrement atteints (score clinique supérieur ou égal à 6) seront mis à mort.

Une perte de poids importante (supérieure à 20% du poids initial) sera considérée comme un second point limite. L'état général de l'animal (prostration, absence de toilettage, pelage hérissé) sera observé tous les jours pour évaluer la douleur des animaux et des mesures de sévérité de la colite (sang dans les selles) seront prises en conséquence. A la fin de l'étude, après mise à mort des animaux, l'inflammation intestinale au sein de l'intestin grêle et du colon sera évaluée par des analyses d'histologie et les différentes populations lymphocytaires présentes dans les intestins seront étudiées en cytométrie en flux. Les données obtenues pour les souris déficientes pour CCR-3 et les souris sauvages ayant reçu l'antagoniste seront confrontées aux résultats obtenus chez les souris sauvages.

12751 Notre équipe travaille sur les vecteurs (principalement de type moustique) et les maladies infectieuses qu'ils transmettent. De ce fait, notre objectif est de produire massivement et de façon constante des moustiques sains. Ces élevages de moustiques sont utilisés sur des projets de recherche en santé publique dans divers domaines :

- évaluation des pesticides utilisés en santé publique dans le cadre d'expertise ou de recherche
- évaluation de nouvelles formules insecticides pouvant donner lieu à des dépôts de brevets.
- recherche sur les maladies infectieuses transmises par les moustiques
- études sur le comportement des moustiques (vis-à-vis d'une molécule répulsive, attractive ou autre, comportement de piqûre...)
- autre objectif : fournir d'autres laboratoires et instituts pour des expérimentations et/ou des modules d'enseignement.

La reproduction des moustiques effectuée en laboratoire permet donc de maintenir les souches et ainsi de les utiliser dans les différents projets évoqués ci-dessus. Pour maintenir des élevages de moustiques, il faut que ceux-ci prennent un repas de sang. Nous utilisons deux techniques pour gorger nos souches de moustiques. La première est le gorgement sur un lapin mis en contention. Les lapins sont placés dans des boîtes de contention pour éviter qu'ils ne bougent et les moustiques sont disposés dans des cages qui sont posées sur leurs oreilles. La contention est maintenue entre 20 et 60 min maximum.

Il existe une seconde méthode, alternative aux gorgements sur lapin, qui consiste à gorger les moustiques sur des membranes artificielles. C'est la méthode de gorgement principale utilisée pour nos souches de moustiques. Actuellement, le sang utilisé pour les membranes vient des lapins de l'animalerie. Cela permet d'être sûr de la qualité du sang. En effet, le prélèvement de sang sur lapin fourni par le personnel de l'animalerie est exempt de tout pathogène véhiculé par les moustiques et ne contient aucun produit insecticide, ce qui ne peut pas nous être totalement garanti par l'Etablissement Français du Sang (risque faible mais non nul de présence de plasmodium ou de possibles molécules aux effets insecticides) ou du sang d'animaux de boucherie (vermifugation entre autre). De plus, les délais d'approvisionnement par l'EFS peuvent être longs et pour les projets de recherche sur les maladies infectieuses, le sang utilisé ne doit pas avoir été prélevé plus de 24h en amont. Nous ne pouvons donc pas nous affranchir des lapins.

Actuellement, nous réalisons deux gorgements par semaine. Nous utilisons 2 à 4 lapins pour la contention par session de gorgement, ce qui fait entre 4 et 8 lapins pour les gorgements sur lapin par semaine.

Nous hébergeons donc au total 13 lapins femelles pour le maintien de l'élevage et les prélèvements sanguins. Le suivi de la mise en contention et des prélèvements sanguins est effectué via l'utilisation d'un fichier de suivi.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Pour les souches de moustique qui ne parviennent pas ou difficilement à se gorger sur ces systèmes artificiels (souche de terrain par exemple), nous utilisons la première méthode décrite, la mise en contention des lapins. De plus, cette méthode est utilisée pour certaines études de comportement, notamment pour les souches dont on étudie le comportement de « piqûre »,

nécessitant l'utilisation de lapin vivant, même si nous privilégions au maximum l'usage de notre méthode alternative.

Réduire : Les gorgements sur membrane pour le maintien de l'élevage sont eux aussi réalisés deux fois par semaine. Mais, le sang destiné au système artificiel pour le maintien des élevages de moustiques sains est utilisée deux fois, ce qui permet de réduire significativement les prélèvements sanguins sur lapins. Nous avons un pool de 4 lapins destinés aux prélèvements sanguins.

Raffiner : Les procédures sont de classe légère. Le bien être des animaux est pris en compte à chaque étape, leur surveillance est quotidienne. Enfin, notre plateforme d'élevage étant située dans un autre bâtiment que l'animalerie et dans l'optique du bien-être animal, une pièce est dédiée à l'accueil des lapins qui serviront à la contention, lorsqu'ils sont transportés de l'animalerie à nos laboratoires, pour qu'ils soient à l'abri du bruit et du passage du personnel de laboratoire.

12752 Au cours de ces dernières années, le domaine de la nanotechnologie et des nanoparticules a subi une croissance fulgurante. Les propriétés uniques des nanoparticules ont permis de très nombreuses avancées dans les domaines technologiques (informatique, électronique), agroalimentaire, cosmétique ou encore médical. Cependant, du fait de leur taille extrêmement réduite (<100nm, soit quelques milliardièmes de mètre), les nanoparticules peuvent passer les différentes barrières biologiques du corps humain telles que la barrière hémato-encéphalique (élément de protection du cerveau) et donc provoquer des effets sanitaires indésirables jusqu'au niveau cérébral. L'émergence de ces nouveaux nanomatériaux dans les produits de consommation courante (aliments, confiseries, peintures, cosmétiques, médicaments...) et la prise en compte des nanoparticules émises lors de certains procédés industriels nous interrogent sur la question des risques sanitaires encourus lors d'une exposition professionnelle et/ou extra-professionnelle.

La principale voie d'entrée des nanoparticules étant le système respiratoire, de nombreuses études ont évalué leur impact au niveau périphérique (bronches, poumon) sans en étudier leurs effets au niveau des centres nerveux respiratoires. Dans la mesure où ces derniers semblent être vulnérables au cours de la période périnatale, cette étude permettra de caractériser chez l'animal (souris) les effets d'une exposition chronique aux nanoparticules d'oxyde de métal de mères gestantes sur l'activité respiratoire (rythme, patron) des nouveau-nés. Ces travaux de recherche auront donc comme objectif d'évaluer la neurotoxicité potentielle des nanoparticules, mais s'inscriront également dans une démarche expérimentale visant à participer à l'évaluation du risque chimique.

Centré sur la vulnérabilité périnatale, le projet sera donc consacré à une étude in vivo d'une exposition chronique au cours de la période fœtale (possibilité d'une transmission verticale materno-fœtale). Pour ce faire, les procédures expérimentales que nous développerons sont d'une part une approche toxicologique afin d'évaluer les effets d'une transmission verticale des nanoparticules de métal (les mères gestantes étant exposées de façon chronique par ingestion), et d'autre part une approche comportementale visant à étudier par pléthysmographie corps entier le patron et le rythme ventilatoire des animaux nouveau-nés ayant ainsi subi une exposition chronique aux nanoparticules au cours de la gestation.

Le projet respecte et applique la règle des 3R :

Remplacer : Les procédures expérimentales décrites dans le projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Réduire : Le projet requiert l'utilisation de 320 souris qui seront suivis d'un point de vue comportemental dans le temps. Ce nombre permettra d'obtenir des résultats statistiquement fiables.

Raffiner Le modèle animal a été choisi en raison de sa pertinence par rapport à la physiopathologie humaine et les méthodologies ont été sélectionnées en accord avec une pratique expérimentale respectueuse du bien-être des animaux. Le laboratoire est doté de l'ensemble des infrastructures (animalerie, salle de chirurgie, salles d'expérimentation) nécessaires à la réalisation du projet et dispose de l'ensemble des agréments requis et délivrés par les services compétents. Les conditions d'hébergements et d'enrichissement respectent les normes dictées par les directives européennes. Nous sommes particulièrement vigilants en ce qui a trait au bien-être animal et la prise en charge

de la douleur. Des points limites précoces et spécifiques de notre étude ont été fixés et des procédures adaptées ont été établies, les mesures prophylactiques et analgésiques incluses dans protocoles permettant de garantir à la fois la pertinence des résultats et le bien-être des animaux. Les chercheurs participant au projet ont une solide expérience dans la manipulation de rongeurs et l'ensemble des compétences requises à sa réalisation. À ce titre, il convient de préciser d'une part que le chercheur par ailleurs référant en matière de bien-être animal au laboratoire prend part au présent projet et d'autre part que le projet est bâti en accord avec les recommandations et conseils de la vétérinaire de l'établissement. Cette dernière sera sollicitée chaque fois que nécessaire par le coordinateur du projet qui lui permettra en outre de suivre, bien que de façon externe, le déroulement du projet et de proposer des procédures de raffinement bénéfiques à tous les égards. Il est à noter que nous avons raffiné nos procédures expérimentales, préférant la prise volontaire per os de nanoparticules à l'injection intraveineuse, ou des méthodes de pléthysmographie corps entier à des méthodes utilisant un masque et pouvant entraîner mal-être et stress.

12753 La Trypanosomose Africaine, parasitose retrouvée en Afrique sub-Saharienne touche aussi bien les Hommes que les animaux. Dans les deux cas, les traitements anciens et non dénués de toxicité présentent de plus en plus de résistances. Or l'urgence de trouver de nouvelles thérapeutiques est immense devant les pertes humaines encore trop nombreuses et les pertes animales provoquant des pertes bouchères et financières pour les populations. Pour répondre à cette problématique, notre équipe a ainsi développé des molécules chimiques dont la structure semble active en l'encontre des parasites responsables de cette maladie, les trypanosomes. Ces derniers, une fois transmis à l'hôte par la piquûre d'une mouche, se multiplient dans les différents fluides biologiques comme le sang et la lymphe et sont capables au bout d'un moment de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour se retrouver au niveau du système nerveux central. Si l'individu n'est pas pris en charge, il décède. Nos molécules ont été testées in vitro sur une souche de parasite appelée *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.9, afin d'évaluer leur activité et déterminer ainsi la concentration inhibitrice 50 qui tue 50% de la population des parasites. A cela s'ajoute des tests de cytotoxicité pour mesurer leur effet sur des cellules en culture et ainsi sélectionner les molécules ayant une meilleure affinité pour les parasites que pour les cellules. A la suite de ces tests, les meilleures candidates au nombre de 3 molécules (sur plus d'une centaine) doivent passer en étude in vivo pour étudier leur efficacité sur un organisme vivant entier avec les contraintes qui lui sont propres (effet de premier passage hépatique, franchissement de la BHE, voie et temps d'élimination) mais aussi d'observer les éventuels effets indésirables qui ne peuvent pas être appréhendés totalement en culture.

Pour répondre à cette problématique, ce projet utilise au total 20 souris/molécule pour l'ensemble des procédures soit 150 animaux au total.

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

Remplacer : Les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier face à l'administration de thérapeutiques, l'impact de la voie d'administration et l'efficacité totale d'un composé face aux processus de métabolisation et d'élimination de l'organisme. Ils sont aussi insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Lorsque tous les tests in vitro (activité, toxicité, pharmacocinétique) ont été réalisés, le modèle murin validé pour cette pathologie permet au mieux de mimer les phénomènes observés chez les autres animaux ainsi que l'Homme.

Réduire : Le modèle d'étude est maîtrisé par l'équipe et le responsable du projet, ce qui permet de limiter les étapes de mises au point. De plus s'agissant d'une étude pilote, le nombre d'animaux utilisé est revu à la baisse pour pouvoir apprécier l'efficacité des molécules testées tout en utilisant qu'un faible nombre d'animaux. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée pour ces études précliniques.

Raffiner : Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le

stress et la souffrance des animaux (anesthésie lors de l'administration, euthanasie dès les premiers signes de souffrance).

La ou les meilleures molécules répondant à l'ensemble de ces critères pourront alors être envisagées comme futurs traitements en médecine humaine ou vétérinaire.

12754 Le cancer colorectal (CCR) est le 3^{ème} cancer le plus fréquent. Seule la moitié des patients sont encore vivants 5 ans après diagnostic. Une meilleure connaissance de la carcinogenèse colorectale, du développement des tumeurs primaires à l'établissement de leurs métastases, est nécessaire pour trouver de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques. Les cellules tumorales collaborent avec leur microenvironnement et modulent l'immunité afin de persister et se développer. La glycosylation des cellules tumorales reconnue par les lectines micro-environnementales jouent un rôle clef dans ces processus biologiques. Notre objectif est d'étudier le rôle des lectines immunitaires, en particulier DCIR, exprimé par les macrophages et cellules dendritiques dans la reconnaissance des cellules tumorales d'origine colorectale et l'impact sur le développement de la tumeur. Or, dans le cas du CCR, aucun modèle transgénique murin n'est relevant de la pathologie humaine, les souris développant les tumeurs au niveau intestinal et non colorectal. Ainsi les modèles précliniques décrits ici, reposant sur l'utilisation de lignées colorectales épithéliales murines greffées chez la souris, nous permettront de caractériser la collaboration entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, en particulier les macrophages, et d'évaluer in-vivo le rôle des lectines macrophagiques dans la rejet ou l'établissement de la tumeur. L'évolution du cancer dans les modèles précliniques sera suivie par des mesures des tumeurs sous-cutanées (à l'aide d'un caliper) et de l'imagerie in vivo par bioluminescence pour les tumeurs localisées en profondeur dans l'animal.

Respect de la règle des 3R,

Remplacer : Notre étude vise à mieux comprendre les mécanismes complexes entre le système immunitaire et le développement de tumeurs. Les modèles d'études in vitro ne permettent pas la reconstruction d'un microenvironnement complet, reflétant la réalité d'une tumeur d'un patient. Pour répondre à notre question scientifique, nous avons pour l'heure encore besoin de l'animal.

Réduire : Nous utiliserons 810 souris pour ce projet. Nous avons intégré des étapes dans notre raisonnement. Tout d'abord, notre étude vise à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires et interactions complexes avec le système immunitaire influençant le développement des tumeurs colorectales et les métastases. Le modèle d'étude doit nécessairement refléter cette complexité impliquant plusieurs types cellulaires du microenvironnement entourant les cellules souches tumorales. Dans ce cadre, des expériences préliminaires in vivo, réalisées par nos collaborateurs, ont fourni des données suffisamment prometteuses pour valider l'utilisation du modèle murin. Ensuite, certaines étapes de nos projets (clairement identifiées dans les procédures détaillées) pourront en effet être suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des promesses offertes par les résultats.

De plus, nous avons développé des approches expérimentales permettant d'analyser sur un même lot d'animaux, des paramètres qui étaient avant mesurés sur des lots d'animaux séparés (exemple : préparation d'ARN, cytométrie de flux, peuvent maintenant être réalisées sur le même échantillon). Finalement, les expériences réalisées par nos collaborateurs dans les années précédentes, nous ont fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs.

Raffiner : La souffrance et/ou le stress animal sont présents à trois niveaux dans nos expériences : i) lors de l'implantation de la tumeur en sous-cutanée ou dans le colon ; ii) lors de l'inflammation induite par la tumeur et iii) lors de l'injection de luciférine nécessaire pour l'imagerie in vivo. Ces trois niveaux de douleurs font l'objet d'une prise en charge spécifique indiquée dans les procédures respectives et déjà appliquées dans nos projets antérieurs. Au cours de ces expérimentations, le maximum sera fait pour réduire la souffrance et l'angoisse des animaux. Les souris seront anesthésiées pour procéder à l'implantation des cellules tumorales et seront ensuite placées sur des tapis chauffants pour éviter l'hypothermie et fournir un confort optimum. Elles

recevront une alimentation riche et sucrée pour favoriser la récupération post-implantation et des injections intrapéritonéales de sérum physiologique si une déshydratation est observée. La souffrance et l'angoisse de l'animal seront évaluées quotidiennement et durant le suivi expérimental, par des observations comportementales des souris. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12755 Le cerveau est un organe privilégié au sein de l'organisme, notamment du fait de l'existence de barrières sang-cerveau qui protègent et contribuent aux besoins du cerveau. Ces barrières sont de deux types : la barrière hémato-encéphalique (entre le sang et le tissu cérébral) et la barrière sang-liquide céphalorachidien (entre le sang et le liquide qui entoure le cerveau).

Au cours de la période périnatale, le cerveau par l'intermédiaire de ces barrières sang-cerveau peut être soumis à des traumatismes multiples : inflammation, hypoxie (manque d'oxygène) ou autres facteurs de risque tel que le retard de croissance intra-utérin (RCIU). Ces traumatismes, surtout lorsqu'ils sont associés, peuvent être responsables de déficiences sévères à long terme. En France, on estime que la moitié des déficiences sévères constatées chez l'enfant de 7 à 8 ans est d'origine périnatale.

L'objectif de notre projet est d'évaluer les lésions induites par l'inflammation sur le cerveau en développement. Nous définissons pour cela trois modèles différents : RCIU, RCIU-inflammation et inflammation-hypoxie. Nous souhaitons comprendre le lien entre les lésions cérébrales et l'altération des barrières sang-cerveau. Notre projet permettra de mieux comprendre comment et pourquoi surviennent des lésions cérébrales sévères en période périnatale. Nous avons également pour objectif de mieux prendre en charge ces lésions sévères en testant l'efficacité d'une molécule neuroprotectrice pour prévenir ou diminuer ces déficiences.

Le nombre total d'animaux pour ce projet est de 464. La procédure 1 nécessite 4 rates. La procédure 2 compile plusieurs modèles de pathologies périnatales (inflammation, hypoxie et retard de croissance) et plusieurs types d'observations (prélèvements pour analyse histologique et mesure de perméabilité de la barrière sang-cerveau). Deux temps différents sont choisis car les fenêtres de susceptibilité varient considérablement au cours du développement. Cette procédure nécessite donc un nombre important d'animaux : 384. La troisième procédure avec examen IRM nécessite 76 rats.

Procédure 1 (classe légère) : L'objectif de cette procédure est de générer des rats avec un retard de croissance à la naissance qui seront employés pour les procédures 2 et 3. Des expérimentations antérieures ont permis de montrer qu'une alimentation pauvre en protéine chez la rate gestante permettait de diminuer de 15% le poids de naissance des rats. Les rats poursuivent après la naissance leur croissance pondérale et retrouvent un poids identique aux autres rats au 21^{ème} jour après la naissance.

Procédure 2 (classe légère) : L'objectif de cette procédure est d'obtenir les modèles de pathologies périnatales afin de réaliser des analyses histologiques et la mesure de la perméabilité entre le sang et le cerveau. Le modèle de pathologie comprenant retard de croissance et inflammation sera obtenue à l'aide de l'injection en intra-péritonéal d'un composant de la paroi bactérienne au 2^{ème} jour ou au 8^{ème} jour après la naissance. Cette injection permet de mimer une réponse inflammatoire sans impliquer de réelle infection. Le modèle comprenant inflammation et hypoxie sera obtenu à l'aide d'une chambre à hypoxie dans laquelle les rats seront placés pendant deux heures. Dans chacun de ces modèles un agent pharmacologique sera testé.

La mesure de perméabilité sang-cerveau sera obtenue par l'injection d'un traceur inerte par voie intra-péritonéale. Les rats seront euthanasiés pour la réalisation de prélèvements permettant la mesure de perméabilité sang-cerveau.

Procédure 3 (classe légère) : Au cours de cette procédure, nous réaliserons des examens d'imagerie par IRM aux rats après l'induction des modèles de pathologies périnatales précédemment décrits. Les examens auront lieu au 3^{ème}, 9^{ème} et 21^{ème} jour après la naissance. Tous les rats seront euthanasiés à l'issue du dernier examen IRM au 21^{ème} jour.

Application de la règle des 3R :

Remplacer : Les cultures cellulaires ne permettent malheureusement pas de mimer des pathologies périnatales tels que le retard de croissance. Par ailleurs notre projet a pour ambition de mettre en lien les altérations de la barrière sang-cerveau avec les atteintes du cerveau et ces observations ne peuvent se concevoir en dehors d'un modèle in vivo.

Réduire : Les portées sont d'au moins 12 ratons et nous pourrions réaliser ainsi des comparaisons au sein d'une même portée. Concernant la procédure 1, les rates gestantes pourront être remises en reproduction afin de limiter le nombre de rates auquel nous aurons recours.

Raffiner : Toutes les procédures pouvant provoquer une douleur seront réalisées sous anesthésie. Le poids des rates gestantes ainsi que des ratons issus du modèle de retard de croissance sera suivi très régulièrement (tous les trois jours). La méthode d'induction du RCIU par un régime isocalorique pauvre en protéines permet de s'abstenir d'une chirurgie contrairement aux autres modèles animaux retrouvés dans la littérature. Après traitement ou manipulation les ratons seront replacés avec la rate avec suivi du comportement maternel et de l'allaitement. Une grille de score permettra d'évaluer le bien-être de chaque animal. L'exploration par IRM a lieu dans un site proche de l'animalerie (500 mètres), nous veillerons à utiliser une cage de transport dédiée avec un contrôle de la température lors du transport de l'ensemble de la portée.

12756 Nous nous intéressons à la sclérodémie systémique (ScS), une maladie auto-immune rare (9/100000 habitants) et au pronostic vital sombre dans les formes sévères. Elle associe une vasculopathie sévère (atteinte des cellules endothéliales des petits vaisseaux), des anomalies immunologiques (présence d'auto-anticorps et de cellules immunes auto-réactives) et une fibrose touchant la peau et les organes internes. A ce jour, il n'existe aucune thérapeutique efficace contre la fibrose qui est responsable d'une altération profonde de la qualité de vie des patients et qui grève leur espérance de vie, notamment quand la fibrose touche les organes vitaux comme les poumons par exemple. Ainsi, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de cette maladie afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourraient améliorer le devenir des patients atteints de ScS.

Le système immunitaire semble jouer un rôle important dans l'établissement de la fibrose au cours de la ScS. Des études précédentes ont démontré qu'une population particulière, les ILC2 (cellules lymphoïdes innées de type 2), étaient impliquées dans des modèles murins de fibrose hépatique et pulmonaire. Nos résultats préliminaires, obtenus chez l'Homme et de manière in vitro, montrent la potentielle implication des ILC2 dans la fibrose au cours de la ScS.

L'objectif de cette étude est donc de montrer in vivo l'implication des ILC2 dans l'établissement de la fibrose afin de confirmer nos observations in vitro obtenus chez l'Homme.

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences, 1200 souris sur une période de 3 ans.

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

Remplacer : Afin de pouvoir moduler de manière spécifique le système immunitaire et d'étudier l'effet de molécules potentiellement thérapeutiques pour la ScS, l'utilisation de modèles murins de cette maladie est nécessaire et indispensable.

En effet, il n'y a pas de méthode alternative dans la mesure où seul un modèle murin nous permettrait d'apporter la preuve de concept de l'intérêt de cibler les ILC2 à des fins anti-fibrotique chez les patients sclérodermiques. De plus, les modèles murins de la ScS ont de nombreuses caractéristiques comparables à la pathologie humaine, comme la fibrose cutanée, et permettront ainsi un transfert plus efficace de nos résultats aux patients.

Réduire : : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur l'implication des ILC2 et l'efficacité du traitement dans la pathologie.

Raffiner : Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte et suivi de leur naissance à leur mort afin d'éliminer ou de réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ou tout dommage durable susceptible d'être infligé aux animaux. Les animaux seront anesthésiés lors des injections. Ils seront suivis quotidiennement par le personnel de l'animalerie agréé qui leur apportera tous les soins nécessaires afin de limiter tout inconfort. De plus, chaque cage reçoit un enrichissement du milieu en l'occurrence des nids de « woodwool ».

12757 Les cardiomyopathies (maladies du muscle cardiaque) d'origine ischémique ou génétique, restent, à long terme, réfractaires aux médicaments actuellement disponibles. Notre projet a pour objectifs d'utiliser des modèles murins de ces pathologies pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour cela, nous utiliserons différentes lignées murines génétiquement modifiées mimant des pathologies génétiques présentant des cardiomyopathies : le syndrome de Cornelia de Lange (mutations du gène NIPBL) et des laminopathies (mutations du gène LMNA).

Le phénotype de ces souris sera analysé par échocardiographie. Cet examen médical est une technique d'imagerie de choix dans le domaine de la cardiologie et est pratiqué quotidiennement pour le suivi des patients. Bien qu'il s'agisse d'une procédure indolore, l'échocardiographie des souris se fait sous anesthésie générale gazeuse durant une trentaine de minutes afin d'assurer une immobilité de l'animal en limitant le stress de la contention.

Sur une durée de deux ans, notre projet utilisera 432 animaux. Pour chacun de nos gènes d'intérêt, nous avons à disposition trois lignées (lignées KO, KI ou conditionnelles) que nous analyserons sous trois fonds génétiques (C57Bl6/J, 129 SV et OF1) pour prendre en compte les variabilités génétiques. Nos groupes d'études seront constitués de 12 animaux mutants et 12 animaux contrôles. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans notre étude, nous avons prévu une étude de type longitudinale au cours de laquelle le même animal sera échographié aux âges de 1, 3 et 6 mois.

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

-Remplacer : l'utilisation de modèles in vivo est nécessaire pour analyser la fonction cardiaque. Il n'existe pas actuellement de modèles ex vivo ou in vitro permettant de récapituler l'ensemble des conséquences des cardiomyopathies.

-Réduire : Le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour mettre en évidence des anomalies de la fonction cardiaque. De plus, cette étude de type longitudinal permet de suivre les animaux au cours du temps, ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés.

-Raffiner : afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture ad libitum, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Des points limites clairs seront définis et les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils atteindront les critères d'interruption.

Cette étude sera réalisée dans un établissement utilisateur agréé et les souris seront manipulées et suivies par du personnel compétent. Les animaux seront hébergés dans des salles dont les paramètres d'ambiance sont contrôlés (température : 22-24°C ; renouvellement d'air : 15 fois/heure ; éclairage artificiel : 12h jour/12h nuit). Afin de respecter leur instinct grégaire, les souris seront hébergées par groupe de 3 à 5 animaux dans des cages dont l'environnement est enrichi à l'aide de maisonnettes en carton ou de papier kraft. Bien que nos souris ne présentent pas de phénotype impactant leur qualité de vie (pas d'athérosclérose, pas de mortalité prématurée), elles feront l'objet d'une surveillance quotidienne afin de détecter précocement les points limites de souffrance.

12758 Le lupus systémique érythémateux (LES) est une pathologie auto-immune rare (~1/2000 habitants), chronique, pouvant affecter de nombreux organes, notamment la peau, les articulations, les reins, le système nerveux et les vaisseaux sanguins. Le LES affecte majoritairement les femmes (~9/10 patients) et peut conduire au décès dans les formes les plus sévères. Les individus atteints de LES présentent de nombreuses anomalies immunologiques. Le système immunitaire est notamment suractivé et se retourne contre le patient en produisant des anticorps dirigés contre son propre ADN. Ces auto-anticorps une fois associés avec leur cible (ADN) se déposent dans de multiples organes

ou ils induisent une inflammation et des dommages irréversibles. A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif, et durant les 50 dernières années un seul nouveau traitement (Benlysta) a été proposé aux patients atteints de LES, montrant une efficacité somme toute très limitée.

Ainsi, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes moléculaires, cellulaires et environnementaux à l'origine de cette maladie afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant améliorer le devenir des patients atteints de LES.

De nouvelles données de notre laboratoire ainsi que des études récentes montrent un rôle néfaste d'une sous-population de cellules sanguines (plaquettes), et des infections virales dans la pathogenèse du LES. En effet, l'activation plaquettaire exacerberait l'auto-immunité par un mécanisme impliquant la production d'une protéine nommée la P-sélectine. Quant aux infections virales, elles participeraient à l'initiation et/ou l'intensification du LES chez les individus génétiquement prédisposés. Cependant l'impact de la P-sélectine et des infections virales sur le développement du LES dans des modèles animaux (in vivo) et notamment leurs mécanismes d'action restent encore méconnus. Nous avons établi un nouveau modèle de LES chez la souris, basé sur la déficience d'une protéine impliquée dans la dégradation/digestion de l'ADN libéré par les cellules mourantes. Ce modèle animal récapitule les caractéristiques principales des patients lupiques, notamment une suractivation du système immunitaire contribuant à une production accrue d'auto-anticorps dirigés contre son propre ADN conduisant à des dommages tissulaires.

Nous proposons d'évaluer le rôle de la P-sélectine et des infections virales dans ce modèle de souris ainsi que d'étudier si le blocage de la P-sélectine peut prévenir et/ou améliorer le développement de LES dans ce modèle de souris.

Malgré des approches ex-vivo et in vitro qui seront utilisées pour répondre à certaines questions spécifiques relatives à ce projet, il n'y a pas d'alternative aux modèles animaux pour récapituler la complexité des interactions existant entre les différents types de cellules en cause dans le LES. De plus, notre modèle murin du LES permettra d'effectuer des essais précliniques de l'efficacité d'un blocage de la P-sélectine et ainsi un transfert plus efficace de nos résultats aux patients.

Afin de réaliser l'ensemble de nos expériences, 1040 souris sont demandées sur une période de 5 ans. Dans le respect de la règle des 3R,

Remplacer : Des méthodologies de culture cellulaire et de modélisation in vitro ont été mises en place afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux pour répondre à certaines questions spécifiques de ce projet. Mais seul un modèle chez la souris récapitulant les éléments de la physiopathologie du LES observée chez l'homme, permettra de vérifier l'efficacité thérapeutique et l'absence de toxicité cellulaire des molécules thérapeutiques testées, mais aussi d'évaluer l'impact des infections virales.

Réduire : Pour nos expériences, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et avoir le nombre de contrôles internes obligatoires, pour prouver l'efficacité des molécules thérapeutiques utilisées. De plus, nous utilisons les animaux mâles et femelles ce qui réduit de 50% l'utilisation des animaux.

Raffinement : Afin de respecter la notion de raffinement, et éliminer ou réduire toute douleur, souffrance, angoisse, ou tout dommage durable, susceptible d'être infligé aux animaux, leur bien-être et leur souffrance seront pris en compte quotidiennement de leur naissance à leur mort grâce à l'utilisation de points limites précoces, adaptés et évalués par le personnel zootechnique expérimenté. Ainsi, pour chaque procédure impliquant une douleur supérieure à celle d'une piqûre, les animaux seront anesthésiés. De plus, chaque cage (type 2L avec 5 souris par cage) recevra du matériel pour nidifier dans le but de rétablir le répertoire comportemental des souris.

12759 L'inflammation est une caractéristique commune à de nombreuses pathologies affectant le système nerveux central. Elle peut être la conséquence mais aussi la cause de certains dysfonctionnements neuronaux. Dans tous les cas, la mise en place d'une inflammation chronique conduit à l'aggravation de la dégénérescence des neurones. Les processus inflammatoires cérébraux représentent donc des cibles de choix pour développer des stratégies thérapeutiques innovantes pour le traitement

des pathologies du cerveau. Dans le cerveau, l'initiation et la propagation de l'inflammation sont principalement médiées par les cellules gliales.

L'objectif du projet est de tester des cibles pharmacologiques exprimées par ces cellules gliales pour évaluer si elles peuvent représenter des cibles intéressantes pour le développement de nouveaux médicaments. Pour ce faire nous utiliserons un modèle reconnu d'inflammation cérébrale développé chez la souris et qui consiste en l'administration d'extrait de parois bactérienne.

Dans cette étude, nous testerons au moins quatre cibles pharmacologiques et utiliserons 320 souris.

Le projet a été établi pour prendre en compte la règle des 3R :

Remplacer : Les cellules gliales sont des cellules extrêmement sensibles à leur environnement. Leurs fonctionnalités sont considérablement altérées lorsqu'elles sont mises en culture. Pour être pertinentes, la validation des cibles doit donc être réalisée in-vivo.

Réduire : Pour réduire le nombre d'animaux, différents types d'analyses (au niveau moléculaire, cellulaire) seront réalisées sur le même animal. Les études seront réalisées à la fois chez les animaux mâles et les femelles, ce qui permettra de comparer directement l'effet du genre et limitera le nombre total d'animaux à produire.

Raffiner : Le protocole d'induction de l'inflammation cérébrale est un protocole non-douloureux induisant des modifications temporaires du comportement chez la souris. Une grille d'analyse déjà existante, avec des points limites adaptés, sera utilisée pour évaluer la souffrance éventuelle des animaux et des soins adaptés leurs seront apportés.

12760 Parce que les troubles cognitifs de la maladie d'Alzheimer sont associés à une accumulation de formes agrégées du peptide beta amyloïde, nous tenterons dans ce projet d'établir le rôle joué par cette accumulation dans la formation de la mémoire au sein des réseaux de neurones dans un modèle Alzheimer chez la souris.

Afin de mimer ce qui est observé chez l'homme atteint par la maladie d'Alzheimer, nous évaluerons l'impact d'infusion de fortes concentrations de peptide beta amyloïde en aigu (3 jours) ou de faibles concentrations en chronique (7 semaines) sur la formation et la consolidation de la mémoire par le biais de tests comportementaux.

Nous suivrons également l'expression de certaines protéines spécifiques aux fonctions de stockage mnésique et tenterons par une approche thérapeutique de restaurer ces fonctions.

Dans ce projet, nous utiliserons 400 souris de type sauvage et 80 souris transgéniques (sans phénotype dommageable).

Dans ce projet nous respecterons la règle des 3R:

Remplacer : Mesurer la formation mnésique ainsi que sa consolidation n'est pas possible via un modèle alternatif ou substitutif, nous ne pouvons donc pas remplacer ce modèle animal.

Réduire : Parce que les modèles murins Alzheimer connus sont principalement transgéniques, nécessitant un élevage local et de grandes quantités d'animaux pour la reproduction et le maintien de la lignée, nous proposons ici un modèle d'induction par infusion qui ne nécessite aucun maintien de lignée. De plus, notre expérience a montré que les tests comportementaux nécessitent 10 animaux par groupe afin de révéler des différences statistiquement significatives avec un pouvoir statistique suffisant, nous ne pouvons donc pas travailler avec moins d'animaux.

Raffiner : Les méthodologies utilisées dans ce projet impliquent la mise en œuvre de toutes les stratégies expérimentales et pharmacologiques disponibles actuellement pour réduire le nombre d'animaux utilisés mais aussi minimiser les possibles effets délétères pour ceux-ci. Ainsi, nos mesures mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales impliquent une induction et suivi de l'anesthésie, une mise en place d'analgésie en pré et post-opération, une installation tout au long des procédures chirurgicales de contrôle de la température par tapis chauffant, avec un respect particulier de la notion de points limites adaptés à chaque procédure (critères d'interruption en cas de souffrance des animaux).

12761 La pisciculture est une filière de production animal en plein essor à travers le monde et nécessitant une profonde réflexion sur l'alimentation des poissons afin de s'affranchir de l'usage des farines et huiles de poissons. Le poisson d'élevage est en voie de devenir l'une des principales sources de protéines destinées à l'alimentation humaine à l'horizon 2050. Les pêches minotières sont stables et la production mondiale de farines et huiles de poissons ne peut plus satisfaire les besoins de cette filière en pleine extension. Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la substitution, l'usage total des végétaux terrestres n'a jamais été atteint en raison d'une forte dégradation des performances de croissance des poissons. Notre projet se propose d'étudier de nouvelles opportunités qui s'offrent aujourd'hui à la filière dans le domaine des matières premières (algues, levures, insectes).

L'enjeu principal du projet sera de formuler et d'évaluer de nouveaux aliments pour le Bar afin d'anticiper la substitution totale de la farine et de l'huile de poissons dans les aliments aquacoles. Il s'agira en pratique de déterminer si ces nouvelles formulations avec ces nouvelles sources de matières premières sont capables d'assurer la durabilité technique, économique et environnementale des systèmes aquacoles français.

Respect de la règle des 3R:

Remplacer : Il n'existe pas de modèle pouvant se substituer à l'expérimentation simulant la croissance du Bar, avec les matières premières utilisées dans ce projet.

Réduire : Avec les acquis du passé sur des expérimentations du même type, ainsi que la définition statistique des degrés de liberté limitants dans l'analyse, le nombre de poissons utilisés par traitement a été réduit à 800 individus.

Raffiner : Une attention particulière est portée sur la méthodologie de manipulation et de stockage dans les bassins en relation avec les travaux antérieurs issus du laboratoire et la bibliographie existante. Le triplicat des poissons nourrit avec un aliment témoin a été remplacé par un seul bassin dont l'objectif est de vérifier que ce groupe de poissons suit bien la courbe de croissance du modèle défini par nos soins. Pour réduire la souffrance et le stress les poissons seront manipulés sous anesthésie pour toutes les mesures individuelles et élevés dans des enceintes appropriées

12762 Nous travaillons principalement sur les maladies de la peau et plus particulièrement sur les cancers induits par les rayons ultraviolets de types B (UVB). Pour se faire, nous avons mis au point un protocole d'irradiation sur un modèle de souris permettant le développement et l'étude des tumeurs cutanées. Le processus de carcinogénèse engagé lors de ces irradiations se décompose en 3 étapes appelées l'initiation, la promotion et la progression tumorale.

Au cours de cette carcinogénèse, plusieurs voies métaboliques sont impliquées et notamment :

-Des dommages à l'ADN

-Des modifications du métabolisme énergétique mitochondrial

-Des changements au niveau du stress oxydatif

Chacune de ces voies fait intervenir des acteurs clés, que l'on appelle des gènes et qui jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement de ces voies métaboliques. Cependant, nous ne connaissons pas à l'heure actuelle le rôle précis et le degré d'implication de ces gènes dans l'initiation, la promotion et la progression des cancers cutanés UVB-induits. Pour se faire, nous allons inactiver ces gènes chez un modèle de souris (via des outils génétiques ou des substances pharmacologiques), individuellement ou deux à deux, de manière à mieux comprendre comment ils fonctionnent et surtout comment ils interagissent entre eux. Notre étude repose principalement sur l'irradiation de souris SKH-1 sauvages et/ou mutées (gènes inactivés) qui seront soumises ou non à un traitement pharmacologique afin d'étudier l'initiation, la promotion et la progression des tumeurs dans les cancers UVB-induits. De plus, il a également été montré que ces 3 voies métaboliques étaient impliquées dans les processus de cicatrisation et de vieillissement cutané. Nous allons donc parallèlement étudier le rôle et les interactions qui existent entre ces gènes cibles dans ces 2 processus. Ainsi pour la totalité du projet, nous prévoyons d'utiliser un total de 5625 souris échelonnées sur 5 ans.

Pour répondre à la règle des 3Rs :

Remplacer : A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives suffisamment prédictives pour mimer les cancers cutanés semblables à ceux de l'homme. Les modèles cellulaires ou 3D actuels nous permettent seulement de travailler sur des dysfonctionnements isolés de la maladie et non sur la maladie dans son ensemble au sein d'un individu tout entier. Nous ne pouvons donc pas remplacer le modèle utilisé par une méthode alternative.

Réduire : Le nombre de souris nécessaire à la réalisation de ce projet a été scrupuleusement réduit au minimum en tenant compte de nos 10 ans d'expériences en matière de cancérogénèse UVB induite. En effet, les souris ne sont pas consanguines et par conséquent, nous avons toujours 2 ou 3 souris qui ne répondent pas aux irradiations ou peuvent avoir des réponses complètement atypiques par rapport au reste du groupe (croissance tumorale trop rapide ou trop lente), ce qui a été bien constaté au cours de nos précédentes expérimentations. Pour ces raisons, nous avons déterminé via des tests statistiques qu'un lot de 15 souris par groupe était nécessaire pour avoir des données statistiquement exploitables à la fin de l'étude. Nous utiliserons également des lots témoins communs afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les animaux qui ne répondent pas favorablement seront néanmoins utilisés pour des prélèvements de peau et serviront de contrôle pour des analyses ultérieures.

Raffiner : Des études pilotes ont été réalisées pour raffiner l'ensemble de nos procédures expérimentales sur les animaux de manière à réduire au minimum les temps d'exposition, les temps de contention et d'isolement afin de prévenir toute souffrance ou angoisse chez nos animaux.

De plus, une surveillance des animaux et une évaluation de leur bien-être sera réalisée quotidiennement par les intervenants et le personnels qualifiés de l'animalerie afin de s'assurer que tout au long du projet les animaux sont en bonne santé, sans comportement anormal ou signes de souffrance. Si toutefois, une souris montre le moindre signe de souffrance ou d'inconfort, un antidouleur lui sera administré. Pour la réalisation de ce projet, nous avons également défini des points limites adaptés à chaque protocole et/ou situation nous permettant de prendre les décisions qui s'imposent face à la souffrance ou l'inconfort de nos animaux.

12763 La fibrillation auriculaire (FA) est le plus commun des troubles du rythme cardiaque, affectant 1 à 2% de la population. En Europe, plus de 6 millions de personnes souffrent de cette arythmie, et sa prévalence devrait croître d'au moins 2.5 fois dans les 50 prochaines années avec le vieillissement de la population. La FA augmente le risque d'accident cérébral de 5 fois, le risque d'insuffisance cardiaque de 3 fois, de 2 à 3 fois la probabilité d'une hospitalisation et de 2 fois le taux de mortalité. La fibrillation auriculaire est principalement déclenchée par un dérèglement de l'activité électrique des cellules musculaires de la veine pulmonaire (VP), cette activité électrique pathologique provoque une excitation cardiaque anormale entraînant un défaut de contraction.

Suite au déclenchement des premiers épisodes de FA, des mécanismes complexes de remodelage se mettent en place et contribuent à l'installation progressive et définitive de la pathologie. A ce jour trois grands types de remodelage ont été identifiés sans que l'on sache si une synergie existe entre eux et si elle existe, est nécessaire à l'installation de la FA. Il s'agit des remodelages électrophysiologiques, métaboliques et structurels, dont le développement dans le tissu semble suivre une chronologie et accompagner la progression de la FA, c'est-à-dire le passage de trouble du rythme auriculaire occasionnel à permanent. Le remodelage électrophysiologique étant le premier à se mettre en place suivi du remodelage métabolique puis structurel qui s'accompagne chez le patient d'une FA persistante et difficilement curable. Par conséquent, le but principal du projet est de comprendre comment les différents types de remodelages influencent la progression de la FA. Un des objectifs cliniques étant d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques de la FA. Ce projet consiste à créer un modèle pathologique par l'implantation d'un stimulateur cardiaque chez la brebis afin d'induire la FA et la maintenir sur une période de 60 jours minimum. Ce modèle permettra d'analyser finement l'impact de la FA sur l'électrophysiologie, la fonction et la structure cardiaque (par de l'imagerie non invasive, échocardiographie et IRM) ainsi que sur le métabolisme général et organique. Les retombées scientifiques principales de ce projet seront (i) la caractérisation du remodelage structurel par IRM et histologie, (ii) l'identification de nouvelles cibles

thérapeutiques localisées au niveau sanguins et tissulaires, et (iii) l'identification de coopérations entre les différents remodelages permettant de mieux comprendre la progression de la FA.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Pour répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires, le remplacement des animaux n'est actuellement pas possible. En effet, l'étude des mécanismes physiologiques complexes dans leur globalité nécessitent d'avoir recours à un modèle animal et il n'existe pas à ce jour de modèle de modélisation pour répondre aux objectifs.

Réduire : Nous avons fixé une limite maximale de 96 brebis au total. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable, tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés dans ce projet. Dans cet objectif de réduction, nous ferons en sorte que chaque brebis soit son propre contrôle.

Raffiner :

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

12764 De nos jours l'épilepsie concerne 50 millions de personnes dans le monde dont environ un quart ne sont pas contrôlés par le traitement médical. Les thérapeutiques invasives actuelles prévoient une ablation du foyer épileptogène par voie chirurgicale lorsque celui-ci a pu être clairement mis en évidence. Aux Etats Unis, on estime à environ 6% la proportion de patients épileptiques qui ont eu recours à la chirurgie entre 2004 et 2009. Seulement 50% de ces patients seront guéris à 10 ans.

L'essor des techniques mini invasives et médecine et en chirurgie a bouleversé la pratique au cours des 25 dernières années. En neurosciences, l'essor rapide de la neuroradiologie interventionnelle a été rendu possible grâce à de nombreux dispositifs endovasculaires permettant de placer sous contrôle scopique direct du matériel (coils ou stent) ou d'injecter un agent embolique liquide. Dans cette dernière catégorie, on dénombre trois agents sur le marché ; le plus ancien étant la colle ou cyanoacrylate (Glubran©), le plus répandu étant l'Onyx © (Ethylène vinyl alcohol polymère) et le plus récent le Phil©. Ces substances sont actuellement utilisées pour l'occlusion de shunt artério veineux cérébraux ou périphériques. A l'heure actuelle, il n'existe pas de cas rapporté dans la littérature d'ablation tissulaire par ischémie dirigée avec ces agents.

Notre précédent projet d'ischémie induite par injection endovasculaire s'est révélé trop aléatoire lors de l'injection de l'agent embolisant. D'autre part l'ischémie induite par cette méthode induisait une trop grande zone de nécrose. C'est pourquoi il a été décidé de modifier la procédure d'induction de l'épilepsie, le but étant d'étudier l'impact d'une ischémie cérébrale sur l'évolution de l'épilepsie. Ainsi nous prévoyons de réaliser une ischémie focalisée photo induite par injection systémique de rose Bengale sur un modèle animal de rat présentant un foyer épileptogène créé par injection intra crânienne de toxine tétanique.

Cette étude in vivo nécessitera une mise au point préalable, pour optimiser les gestes à réaliser, et ainsi réduire le nombre d'animaux pour chaque groupe. C'est le rat Sprague-Dawley qui a été choisi comme modèle. Un total de 30 animaux est prévu soit 3 groupes de 10, permettant ainsi la phase de mise au point, puis la comparaison de 2 groupes après l'induction d'une épilepsie.

Dans le cadre de ce projet, tout sera mis en œuvre pour respecter au mieux la règle des 3R :

(Remplacer) Il s'agit d'une étude basée sur un modèle expérimental d'épilepsie néocorticale focale et une analyse histologique témoignant de remaniements inflammatoires. Il n'existe pas de méthode

alternative permettant de reproduire les réactions d'un organisme entier face à de multiples interactions biologiques simultanées.

(Réduire) Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum, en considérant toutefois un nombre suffisant permettant d'observer une différence significative entre les groupes.

(Raffiner) La souffrance et l'angoisse de l'animal seront prévenues par la réalisation d'une anesthésie générale pendant toute la durée du protocole et notamment de la craniotomie pour implantation intra crânienne des électrodes EEG et réalisation de l'injection de toxine tétanique par stéréotaxie. Une étude des comportements sera réalisée en post opératoire avec adjonction, si besoin, d'antalgiques. Le protocole portera également sur la réalisation d'un infarctus cérébral expérimental (indolore chez l'homme) qui sera obtenu par ischémie photo induite, sans craniotomie avec injection intra veineuse de rose Bengale. Une euthanasie précoce sera décidée en cas d'apparition de signes de souffrance animale, impossible à soulager. L'ensemble des personnels impliqués dans le projet est compétent et formé à l'expérimentation animale.

12765 Le cancer du pancréas est au 5ème rang des causes de mortalité par cancer dans le monde. Environ 14 000 nouveaux cas apparaissent chaque année. Le diagnostic est souvent réalisé à un stade avancé du fait d'une expression clinique tardive de la maladie. Seuls 20% des patients sont diagnostiqués à un stade où la tumeur est résécable par chirurgie. Tous stades confondus, la survie à 5 ans est de seulement 5%. Les traitements proposés actuellement sont la chimiothérapie et la radiothérapie. Ces traitements, qui induisent des effets secondaires importants ne permettent pas de guérir le cancer. Notre objectif est de développer une thérapie basée sur l'utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer. Il a en effet été montré que l'on peut induire de l'hyperthermie dans des tissus en excitant des nanoparticules d'oxyde de fer via un champ magnétique alternatif. Si l'hyperthermie est suffisamment forte, elle induit la mort cellulaire. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont déjà utilisées comme agent de contraste IRM, on sait donc qu'elles sont bien tolérées par l'organisme, cependant afin d'améliorer la biocompatibilité, il a été décidé de les recouvrir d'or. Par ailleurs, de manière à avoir une synthèse « verte », elles sont synthétisées à base d'extraits de plantes endémiques de la Réunion. Plusieurs nanoparticules ont été synthétisées et seront évaluées prochainement in vitro (cytotoxicité, internalisation, activité anti-tumorale) sur des lignées tumorales d'adénocarcinomes pancréatiques (PDAC) afin de ne retenir que les nanoparticules présentant une activité anti-tumorale importante à une dose non cytotoxique. Afin d'obtenir ces modèles « in vivo », la solution la plus utilisée consiste à injecter des cellules humaines tumorales issues de patients en orthotopique à des souris immunodéprimées (de manière à ce que leur système immunitaire ne rejette pas la greffe tumorale). Dans le cas présent, des cellules humaines Mia-PaCa-2 et PANC-1 (les deux lignées les plus utilisées pour le modèle de PDAC pour l'évaluation de thérapies) seront injectées à des souris Balb/c nude. Avant de pouvoir utiliser ces modèles pour évaluer une thérapie, il est important de les caractériser (taux de prise de greffe, courbe de croissance tumorale...), ainsi le nombre d'animaux à utiliser pourra être clairement établi ainsi que le temps auquel injecter le traitement et les points limites : c'est l'objectif de ce projet. Le passage par le modèle in vivo est pour l'instant inévitable pour tester de nouvelles thérapies, mais en caractérisant le modèle en amont cela permettra lors des prochaines études sur ces modèles, lorsque des candidats médicaments auront été retenus, de ne pas utiliser plus de souris que nécessaire, de maîtriser complètement le protocole de greffe et de suivi et de déterminer des points limites de manière à ne pas induire de souffrance chez l'animal.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Les tests in vitro réalisés en amont représentent une première étape importante mais qui ne suffit pas à valider une molécule, en effet, une tumeur ne se résume pas à des cellules tumorales, il y a aussi tout le microenvironnement tumoral à prendre en compte. C'est pourquoi il est nécessaire de tester ces molécules sur un modèle in vivo qui se rapproche le plus possible de la situation clinique

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire pour acquérir les informations souhaitées, c'est-à-dire 5 souris par lignées tumorales soit 10 souris au total. Ce nombre a pu être

diminué en utilisant une technique d'imagerie non invasive pour le suivi de la croissance tumorale, évitant ainsi le sacrifice d'animaux à différents temps.

Raffinement : Les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie accompagnée d'analgésiques. Lors de l'imagerie les animaux seront là aussi anesthésiés et placés sur des tapis chauffant afin de maintenir leur température. Le suivi par imagerie permettra d'interrompre l'étude avant que les tumeurs n'aient atteint des volumes trop importants. Enfin les animaux seront surveillés quotidiennement pour détecter tout inconfort lié au protocole.

12766 Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par l'accumulation de mutations dans leur génome. Ce phénomène est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du côlon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite du dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable du maintien de l'intégrité du génome. Il est connu que les cancers de type MSI sont de meilleur pronostic par rapport aux tumeurs de type non MSI (ou MSS pour Microsatellite Stable) caractérisés par des mutations dans la structure des chromosomes (instabilité chromosomique). Le développement tumoral semble être lié aux mutations du gène APC (pour Adenomatous Polyposis Coli) qui joue un rôle majeur dans le contrôle de la qualité du génome.

Nous avons identifié une mutation du gène HSP110 dans les cancers colorectaux (CCR) MSI, responsable de l'expression d'une protéine mutante d'HSP110 (appelée HSP110DE9). Nos études ont montré que la protéine mutante d'HSP110 est anti-tumorale et elle sensibilise les cellules cancéreuses aux traitements de chimiothérapie.

Notre objectif est d'étudier in vivo le rôle de la protéine HSP110DE9 dans la réponse à la chimiothérapie de tumeurs coliques de type MSI dans un modèle murin. Pour ceci, nous comptons utiliser une souris transgénique mutée sur le gène HSP110 et qui a l'expression de protéine mutante HSP110DE9. Cette souris sera croisée avec la souris APC qui développe des cancers coliques et qui porte aussi la mutation du gène de réparation MSH2, ce qui rend les cellules déficientes pour le système de réparation MMR (et donc MSI). Notre hypothèse est que la mutation HSP110DE9 pourrait induire une amélioration/modification du tableau clinique des animaux avec une meilleure réponse aux traitements de chimiothérapie.

Respect de la règle des 3R ;

Remplacer: Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement tumoral qui est au cœur de ce projet. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu. Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble.

Réduction : Ce projet impliquera l'utilisation de 180 souris transgéniques pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

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

12767 En l'absence d'infection, le microbiote intestinal est impliqué dans la physiopathologie de maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète de type 2, l'athérosclérose et la stéatohépatite non

alcoolique. De nombreuses études montrent que certaines espèces bactériennes peuvent avoir un effet protecteur contre ces maladies, tout comme une dysbiose du microbiote peut quant à elle avoir un rôle délétère. Des transferts de microbiote de souris à souris ou d'humain à souris permettent d'étudier d'un point de vue mécanistique le rôle causal ou protecteur du microbiote dans différentes pathologies. Il a en particulier été montré par transfert d'humain à souris qu'un microbiote riche en bactéries du genre *Bifidobacterium* et *Butyrivibrio* tout en étant pauvre en *Parasutterella* aggravait la maladie alcoolique du foie par rapport à un microbiote normal. De plus, il a récemment été montré que des souris colonisées avec le microbiote d'individus obèses ayant subi une chirurgie bariatrique prennent moins de poids que des souris colonisées avec le microbiote d'individus obèses. Ces études mettent en évidence le rôle crucial du microbiote dans les pathologies à composante métabolique. Néanmoins, il n'existe pas de consensus quant à la méthodologie adaptée pour réaliser ces transferts de microbiote. De plus, la qualité du transfert c'est-à-dire la proportion d'espèces bactériennes du donneur s'implantant chez le receveur est rarement évaluée.

Notre objectif est de déterminer les conditions optimales de réalisation d'un transfert de microbiote, en particulier :

- D'évaluer l'impact du stade de maturation immunitaire et donc de l'âge des souris au moment du transfert,

- D'étudier l'effet de la présence d'un microbiote initial avant l'implantation d'un nouveau microbiote,

- Et enfin, de comparer différentes méthodologies pour éliminer le microbiote initial des souris.

Le microbiote de souris au sevrage est évalué à environ 150 espèces, contre 500 à 1200 pour les adultes. De ce point de vue, le sevrage est une fenêtre théoriquement favorable à l'implantation d'un nouveau microbiote. De plus, l'immaturité du système immunitaire à ce stade permet une pression moindre sur le microbiote implanté. Ces éléments font à priori du sevrage la fenêtre temporelle la plus favorable pour le transfert d'un microbiote et permettraient de s'affranchir en partie des obstacles liés à l'utilisation de souris de statut conventionnel ou SPF (Specific pathogen free) plutôt qu'axéniques.

Ces souris axéniques, dites « germ free » et donc sans microbiotes sont plus difficilement disponibles que les souris de statut conventionnel ou SPF, elles sont plus coûteuses et peu de lignées sont disponibles. Elles nécessitent également des équipements spécifiques (isolateurs...) peu courants. Lors de précédentes études au laboratoire, nous avons remarqué qu'au cours de l'antibiothérapie, le microbiote des souris receveuses descendait à moins de 1% de son niveau initial, et ce dès la première semaine de traitement. Il est donc possible que ces souris à microbiote déplété permettent un transfert de microbiote d'aussi bonne qualité que les souris axéniques. De plus, il n'est pas impossible qu'une simple purge du tube digestif avec des laxatifs soit suffisante pour libérer la niche écologique, nous voulons donc comparer les implantations après différentes méthodologies de déplétion du microbiote.

Il est admis que le transfert de microbiote de souris obèses à souris sauvages induit une prise de poids et des changements métaboliques. De ce fait, nous souhaitons utiliser des souris ob/ob comme donneuses de microbiote. En effet, des souris sont génétiquement obèses et leur phénotype est partiellement transmissible à des souris sauvages par transplantation de microbiote (modèle de souris obèses).

Pour chaque condition expérimentale, un groupe de 3 souris donneuses de microbiote, un groupe de 6 souris ob/ob contrôle positif et des groupes de 10 souris seront constitués. Le nombre total d'animaux prévu est de 69 souris.

Respect de la règle des 3R,

Remplacer : L'étude de l'écosystème microbien digestif et son impact sur les maladies métaboliques ne peuvent être réalisés in vitro. En effet, la majorité des bactéries digestives ne survivent pas en dehors de leur hôte en l'occurrence la souris, ce qui nécessite le recours au modèle murin.

Réduire : Le nombre d'animaux correspond au nombre minimal de groupes et de souris nécessaires afin d'obtenir des résultats scientifiquement pertinents et statistiquement fiables. En effet, nous

avons renoncé aux conditions expérimentales théoriquement moins favorables à l'implantation d'un nouveau microbiote intestinal, c'est-à-dire l'inoculation chez des souris adultes après traitement antibiotique et après traitement laxatif, ce qui diminue de 20 le nombre de souris de l'expérience. De plus, 10 souris par groupe est le nombre minimal permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables compte tenu de la variabilité interindividuelle des paramètres mesurés (poids, tolérance au glucose, sensibilité à l'insuline). Dans le cas des souris génétiquement obèses, leur phénotype est suffisamment extrême pour que 6 souris soient suffisantes pour obtenir des résultats statistiquement puissants.

Raffiner : L'ensemble des manipulations effectuées sur les animaux sont de classe légère à modérée. Nous prendrons soin de les faire exécuter par des personnes expérimentées et compétentes afin de réduire la sévérité et l'intensité de la douleur ainsi que le stress généré au maximum. Nous avons également choisi un matériel et des procédures adéquats pour limiter la douleur et le stress, avec en particulier l'utilisation des sondes de gavage en plastique les plus fines et souples possibles. Nous avons lors d'expériences précédentes déterminé la durée minimale des traitements pharmacologiques (antibiotiques et laxatifs) nécessaire pour obtenir l'effet voulu afin de limiter les manipulations et les inconforts engendrés (7 jours pour les antibiotiques et 2 gavages à 12h d'intervalle pour les laxatifs). Un suivi bihebdomadaire de prise alimentaire et du poids sera réalisé, ce qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux ainsi que de les habituer aux manipulations et ainsi de générer moins de stress lors des procédures ultérieures (tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline). De plus, un laps de temps de minimum 2 semaines entre les procédures de classe modérée sera respecté afin de laisser un temps de récupération aux animaux.

12768 Les traitements conventionnels contre le cancer (radiothérapie, chirurgie et chimiothérapie) ont une action destructrice directe sur les cellules cancéreuses mais également sur les cellules saines. Par ailleurs, ils ne préviennent pas du risque de récurrence. Depuis quelques années, notre laboratoire travaille sur la capacité des certains traitements anticancéreux (anthracyclines ou oxaliplatine) à activer le système immunitaire grâce à l'induction de la mort cellulaire. L'utilisation de méthodes de génotypage à haut débit nous a permis d'identifier deux polymorphismes affectant les gènes, FPR1 (Formyl Peptide Receptor 1) et TLR3 (Toll Like Receptor 3), impliqués dans l'efficacité de la chimiothérapie. Ces mutations ont été corrélées à une plus faible survie chez des patients atteints de cancer du sein, recevant des anthracyclines. Le but de ce projet est de compenser les effets provoqués par l'absence des gènes FPR1 et TLR3. Ce projet vise à une compensation des défauts associés aux pertes de fonction de FPR1 et TLR3, des facteurs pronostiques négatives pour la réponse aux traitements anticancéreux à base d'anthracyclines, afin d'orienter la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques chez les patients atteints de cancer du sein. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris immunocompétentes (n. 1140) et des souris transgéniques C57Bl/6 Fpr1 (n. 660), accessible dans le commerce et qui sont viables, fertiles, de taille normale et ne présentent pas d'anomalies physiques ou comportementales.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Notre question scientifique ne peut être abordée qu'in vivo en utilisant des animaux car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale dans des systèmes in vitro.

Réduire : Dans la réalisation de ce projet, qui nécessite au total 1800 animaux, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences nécessaires pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail.

Raffiner : Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de

l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

12769 Le processus fibrosant, c'est-à-dire la formation excessive de tissu conjonctif fibreux en réponse à une atteinte tissulaire souvent inflammatoire, est à l'origine de nombreuses maladies dites 'fibroses'. Elles se traduisent par une rigidité anormale des organes (poumon, foie, rein, cœur, peau...) pouvant avoir à terme, des conséquences létales. Parmi les besoins médicaux que nous avons identifiés, la fibrose pulmonaire idiopathique (IPF), qui touche environ 17000 personnes en France et 3 millions dans le Monde, est une maladie limitant l'espérance de vie des patients à moins de 2 ans après le diagnostic. Le traitement actuel des stades légers à modérés repose sur deux molécules dont l'efficacité reste insatisfaisante. Ces traitements ralentissent la progression de la cicatrisation des poumons, mais n'atténuent pas toujours les symptômes de la toux et de l'essoufflement.

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

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

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

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

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

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Dans le cadre de ce projet, plusieurs milliers de molécules seront produites et testées in vitro avant d'en sélectionner une dizaine pour l'évaluation in vivo, qui est une étape indispensable pour les étudier dans une des modèles récapitulant la complexité de la pathologie

Réduire : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire, nous utilisons un logiciel de lois statistiques permettant de calculer le nombre minimum de souris indispensable pour montrer que l'effet de nos composés est significatif par rapport aux animaux malades contrôles. L'évolution de la maladie et de l'efficacité de nos composés sera suivie en imagerie sans avoir à mettre séquentiellement des animaux à mort. Le nombre total d'animaux qui pourraient entrer dans ce projet serait de 18075 sur une période de 5 ans. Tous les candidats médicaments ne seront pas testés dans tous les modèles de fibrose ; ainsi ce nombre théorique maximum ne sera pas atteint.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé en continu (température, pression, hygrométrie, renouvellement d'air, alternance jour/nuit) relié à un système d'alarme. Ils bénéficieront d'un enrichissement du milieu adapté à l'espèce et à l'étude. La densité dans les cages sera en conformité avec les recommandations et autant que possible, les groupes d'animaux dans les études resteront ceux formés pendant l'acclimatation. Les animaux et leurs conditions d'hébergement (environnement, nourriture, eau de boisson) seront sous surveillance quotidienne. Certains de nos modèles peuvent apporter de l'inconfort. Nous avons donc établi une liste de points limites au-delà desquels les traitements seraient suspendus ou arrêtés. Pour chaque modèle, un programme d'analgésie sera mis en place. Enfin, la veille de la littérature nous permet de remplacer certains modèles ou procédures par de nouveaux modèles tout aussi pertinents mais présentant moins d'impact sur le bien-être animal.

12770 La cornée est le tissu le plus densément innervé de l'organisme. Les nerfs cornéens assurent la sensibilité proprioceptive (sensation de toucher) et nociceptive (sensation de douleur et de variation de température) et jouent un rôle important dans le réflexe de clignement, de production de larmes et de cicatrisation cornéenne.

De nombreuses études ont mis en évidence le lien entre la dysfonction de l'innervation cornéenne et l'apparition d'atteintes cornéennes. Ces atteintes vont de la simple sécheresse oculaire jusqu'à des pathologies cécitantes comme la kératite neurotrophique. Environ 285 millions de personnes dans le monde souffrent de déficience visuelle sévère, dont 10% liée à une atteinte cornéenne. De même, parmi les 40 millions personnes aveugles dans le monde, plus de 1.5 millions sont atteints de pathologies cornéennes. L'atteinte de l'innervation cornéenne est fréquemment responsable des pathologies cornéennes entraînant une baisse importante d'acuité visuelle. Ces atteintes peuvent être secondaires à de nombreuses pathologies infectieuses ou inflammatoires de la cornée. Aucun traitement n'est actuellement disponible en routine malgré le nombre important de patients concernés.

Dans ce projet, nous étudierons l'effet de plusieurs molécules pharmacologiques sur la régénération des axones cornéens sur des souris transgéniques après lésion de la cornée. Au total, 180 souris seront utilisées dans ce projet.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'utilisation de l'animal est indispensable dans le projet car il n'existe pas de modèle in vitro permettant de suivre les mécanismes de régénération de l'innervation cornéenne.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus.

Raffiner : Les lésions de la cornée s'effectueront sous anesthésie générale et la cornée sera en plus anesthésiée localement. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux auront à leur disposition des carrés de cellulose, des bâtons à ronger, un tunnel et une maisonnette.

12771 Ce projet d'une durée de cinq ans consiste à explorer en IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) les conséquences neurologiques d'un traumatisme crânien (TC) sévère chez le rat. Le TC est la première cause de handicap chez les moins de 40 ans et l'étude de ses conséquences comportementales et neurologiques est une priorité. Si plusieurs modèles de TC léger et modéré sont disponibles actuellement, l'étude du TC sévère est encore peu développée. Un TC sévère chez l'homme correspond à un choc important qui provoque un arrêt respiratoire, une perte de conscience de plus de trente minutes et souvent, des déficits neurologiques de long terme. Il existe peu de modèles animaux permettant de reproduire cette pathologie et de comprendre les mécanismes neurobiologiques responsables des lésions et des déficits observés chez les patients. La recherche clinique est difficile car chaque traumatisme est un cas particulier de par le site d'impact, la présence de complications comme l'hémorragie méningée, l'œdème cérébral, les défaillances cardiaques ou respiratoires etc. Notre équipe a récemment mis au point un modèle TC sévère chez le rat qui consiste à appliquer une onde de choc de 3.8-4 ATM durant 20 ms sur la

dure mère. Comme en clinique, ce choc provoque un arrêt respiratoire qui nécessite une ventilation mécanique et une perte de conscience de plus de 30 min. En appliquant l'onde de choc de la même manière chez tous les animaux, il est possible d'obtenir des lésions neurologiques très reproductibles, ce qui est un atout inestimable pour la recherche. Nous effectuerons un suivi longitudinal des animaux pendant deux mois après le TC sévère. Les animaux seront testés en IRM afin de mettre en évidence les zones de lésions cérébrales, la perfusion cérébrale et les dysfonctionnements de la barrière hématoencéphalique. Ils seront également testés pour leurs performances locomotrices, sensorimotrices et mnésiques afin d'objectiver leur récupération au cours du temps.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'utilisation de modèles « in vitro » comme les cultures cellulaires ou d'explants n'est pas informative car elle ne permet pas de reproduire les interactions complexes entre le cerveau, les vaisseaux sanguins, le système immunitaire et les organes périphériques. Il y a donc un besoin de modèles animaux permettant de reproduire cette pathologie et de tester de nouveaux médicaments susceptibles d'améliorer la récupération des patients.

Réduire : Ce projet impliquera 55 rats adultes mâles et femelles. Le nombre d'animaux utilisés au cours du projet est maintenu à un niveau minimal permettant des analyses statistiques nécessaires à l'établissement de conclusions fiables. De plus, nous utiliserons l'IRM qui permet un suivi longitudinal non invasif ne conduisant pas à l'euthanasie de l'animal.

Raffiner: Les animaux soumis au protocole de TC sévère sont traités contre la douleur avec des analgésiques puissants comme la buprénorphine, lidocaïne et ropivacaïne. Ces traitements sont maintenus pendant 48 h après le TC. De plus, une grille de score quotidienne permettra l'évaluation de la souffrance des animaux, et de déterminer des critères d'arrêt. Après 48h, les animaux ne montrent pas de signes de souffrance particuliers : ils sont capables de se nourrir de façon autonome et de reprendre leur comportement de toilette. Ils ne sont pas agressifs envers les expérimentateurs, ce qui révèle une absence de souffrance sévère. Tout au long du projet, les animaux seront hébergés dans des cages enrichies (bâton à ronger, tunnel, igloo)..

12772 Les migraines constituent un problème de santé publique ayant un impact négatif majeur dans la vie quotidienne des patients. Les crises de migraine qui concernent 20% des femmes pour 6% d'hommes, sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée ou sévère, unilatérales, pulsatiles, pouvant durer entre 4 et 72 heures en l'absence de traitement. Les femmes sont donc plus touchées par cette pathologie que les hommes, et leur susceptibilité à la migraine varie en fonction de leur cycle menstruel ou des modifications hormonales qu'elles peuvent rencontrer au cours de leur vie (puberté, ménopause, grossesses). Par ailleurs, ces céphalées sont associées à des modifications de la perception sensorielle telles que l'allodynie (douleur provoquée par une stimulation non douloureuse), la phonophobie et/ou la photophobie. Ainsi la physiopathologie de la migraine implique des régions cérébrales multiples pour rendre compte à la fois de la douleur et des troubles sensoriels associés. L'étude des mécanismes physiopathologiques nécessitent donc d'avoir recours à l'animal afin de tenir compte de toutes les interactions cérébrales qui entrent en jeu lors d'une crise migraineuse.

Dans ce projet, nous évaluerons l'évolution de l'intensité de la céphalée ou mal de tête en fonction des variations hormonales qui ont lieu pendant le cycle sexuel chez la femelle dans un modèle murin de migraine. Nous étudierons les modifications au niveau du système nerveux central qui pourraient rendre compte des variations de l'intensité de la douleur chez la femelle en fonction de son cycle sexuel. Notre modèle nécessite une chirurgie pendant laquelle nous implantons une canule pour l'injection des substances inflammatoires. Avoir un modèle qui se rapproche le plus possible des conditions cliniques permettra par la suite de déterminer les substances et doses pharmacologiques susceptibles d'être une alternative aux traitements proposés aux patients migraineux.

Pour respecter la règle des 3R,

Remplacer : L'intégration de la douleur implique de nombreuses régions du système nerveux central et périphérique nécessitant des études in vivo sur l'animal qui ne peut être remplacé par des méthodes alternatives pour l'heure.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum. Le nombre d'animaux dans cette étude tient compte des animaux non répondeurs dans notre modèle mais reste suffisant pour détecter un effet significatif entre les traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non). Au total 72 rats seront nécessaires à la réalisation de ce projet.

Raffiner : Les animaux auront une période d'habitation à l'expérimentateur et aux tests avant de débiter l'étude comportementale. Cette période d'habitation permet de réduire le stress des animaux lors des tests comportementaux et ainsi de réduire le nombre d'animaux. Les animaux sont placés dans des cages enrichies (rouleaux permettant de se cacher) ce qui permet de réduire le stress des animaux. Les animaux auront accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. D'après les études précédentes, notre modèle animal n'entraîne pas de dommages tissulaires. Les dommages attendus, mis en évidence précédemment dans notre modèle, sont une douleur céphalique utilisée pour modéliser la crise de migraine. La chirurgie est effectuée sous anesthésie générale (chloral hydrate, 400 mg/kg), les animaux sont placés sur une couverture chauffante pendant le temps de la chirurgie et leur cornée est protégée par une couche de vaseline. Le temps de chirurgie est optimisé au maximum pour qu'il dure le moins longtemps possible. Les animaux sont gardés dans la pièce de chirurgie en observation jusqu'à leur réveil complet. Suite à la craniotomie, un traitement au ketoprofène pendant 3 jours (5mg/kg en sous-cutané) puis au paracétamol (30mg/kg en sous-cutané) pendant 2 jours, sera administré. Les animaux seront observés tous les jours par l'expérimentateur. Ils seront pesés tous les 2 jours, leur vitalité sera vérifiée (déplacement, alimentation, état général, comportement douloureux). Ils seront mis à mort à la fin des procédures par overdose d'anesthésique.

12773 L'intestin est colonisé dès la naissance par un microbiote qui reste relativement modeste pendant l'allaitement. Lors du sevrage et de la diversification de la nourriture, ce microbiote explose en taille et en diversité, et par conséquent, induit une forte réponse immunitaire que nous avons nommée « réponse de sevrage ». Certains types de bactéries et leurs produits sont impliqués dans cette réponse de sevrage, et activent les cellules T et les macrophages pendant une fenêtre de temps précise et limitée à la 3^e et 4^e semaine après la naissance. Lorsque cette réponse est inhibée, nous avons montré que le système immunitaire ne se régule pas correctement. En conséquence, les réactions à l'infection ou au dommage tissulaire sont exagérées, longtemps encore après le sevrage, à l'âge adulte, et provoquent des maladies inflammatoires et allergiques. Ce projet vise à comprendre comment cette réponse au sevrage est induite par le microbiote et la nourriture, comment elle est mémorisée par le système immunitaire, et d'en comprendre les multiples conséquences sur la santé. Cette étude a pour but ultime de développer des approches préventives contre les maladies inflammatoires chez l'homme, en assurant une régulation adéquate du système immunitaire contrôlée en partie par le microbiote. Nous proposons 7 procédures expérimentales qui explorent les différents mécanismes et conséquences de la réaction de sevrage (4 procédures de sévérité légère, et 3 procédures de sévérité modérée).

Respect de la règle des 3R,

Remplacer : Ces études impliquent l'interaction complexe entre le microbiote et plusieurs types de cellules immunitaires, dans le temps (pendant plusieurs semaines), interactions qu'il est impossible à reconstituer in vitro. Aucune méthode de remplacement n'est envisageable pour l'étude de phénomènes physiologiques aussi complexes. Par contre, tous les outils sont réunis pour effectuer cette étude chez la souris.

Réduire : Des souris C57BL/6 âgées de 9 semaines des deux sexes seront utilisées, au nombre total estimé à 8380., mais nous limitons le nombre de souris au minimum statistique possible.

Raffiner : Nous planifions des procédures dont le raffinement méthodologique est le produit de nos connaissances actuelles. Les expériences qui impliquent une douleur modérée subies pour les

souris, suite à l'évolution de la pathologie inflammatoire, sont surveillées tous les jours et interrompues si la pathologie, et donc la douleur, excèdent les points limites spécifiques.

12774 Les maladies métaboliques, telles que l'obésité et le diabète de type 2, ont une prévalence en constante augmentation au niveau mondial. Ces pathologies sont étroitement associées à une diminution de l'action de l'insuline (insulinorésistance) dans les tissus périphériques ainsi qu'à des modifications du microbiote intestinal et des altérations de la fonction barrière de l'intestin. Ces dernières peuvent être impliquées dans l'établissement de l'inflammation de bas grade qui caractérise ces pathologies ainsi que dans la susceptibilité à déclarer des maladies chroniques inflammatoires de l'intestin. L'épithélium intestinal est un tissu en continu renouvellement, il se régénère intégralement en 4 à 5 jours chez l'Homme comme chez la souris. Cette capacité de régénération est cruciale pour maintenir un épithélium intestinal actif et fonctionnel pour l'ensemble de ses fonctions, ses capacités d'absorption comme pour sa fonction barrière.

L'objectif de ce projet est d'évaluer si une insulinorésistance établie au niveau uniquement de l'épithélium intestinal peut être impliquée dans des modifications des interactions établies avec le microbiote ainsi que dans les capacités de régénération de l'épithélium. Pour cela, nous allons étudier, dans une lignée de souris génétiquement modifiées, les conséquences d'une insulinorésistance exclusivement intestinale sur les interactions avec le microbiote et sur la régénération des cellules épithéliales en réponse à des lésions radio-induites. A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les interrelations existant entre l'insulinorésistance associées au syndrome métabolique et l'altération de l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

Pour respecter la règle des 3R,

Remplacer : Ce projet portant sur l'étude des interactions hôte-pathogène ne peut être réalisé qu'in vivo. Le recours à l'animal est donc nécessaire pour répondre à notre question scientifique.

Réduire : Dans ce projet nous utiliserons 120 souris. Les protocoles ont été élaborés pour utiliser le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.

Raffiner : Nous nous attacherons également à limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une surveillance journalière sera réalisée en respectant des ponts limites bien définis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

12775 Les migraines constituent un problème de santé publique ayant un impact négatif majeur dans la vie quotidienne des patients. Les crises de migraine qui concernent 20% des femmes pour 6% d'hommes, sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée ou sévère, unilatérales, pulsatiles, pouvant durer entre 4 et 72 heures en l'absence de traitement. Ces céphalées sont associées à des modifications de la perception sensorielle telles que l'allodynie (douleur provoquée par une stimulation non douloureuse), la phonophobie et/ou la photophobie. Ainsi la physiopathologie de la migraine implique des régions cérébrales multiples pour rendre compte à la fois de la douleur et des troubles sensoriels associés. L'étude des mécanismes physiopathologiques nécessitent donc d'avoir recours à l'animal afin de tenir compte de toutes les interactions cérébrales qui entrent en jeu lors d'une crise migraineuse.

Dans ce projet, nous testons les principes actifs de la Grande Camomille et de l'écorce de Saule Blanc, qui associées pourraient constituer un traitement de fond des crises de migraine. En effet la Grande Camomille est une plante reconnue traditionnellement pour soulager la migraine, tandis que l'écorce de Saule Blanc a des propriétés anti-inflammatoires. Pour réaliser cette étude, nous utiliserons un modèle murin qui mime la phase de céphalée ou mal de tête de la migraine. Il consiste en l'injection de substances inflammatoires à la surface des méninges. Nous testerons différentes doses des principes actifs de la Grande Camomille (2.5, 5, 10,mg/kg) et de l'écorce de Saule Blanc (2.5, 5, 10 et 20 mg/kg) dans notre modèle pour déterminer la dose la plus efficace. Notre modèle nécessite une chirurgie pendant laquelle nous implantons une canule pour l'injection des substances inflammatoires. Avoir un modèle qui se rapproche le plus possible des conditions

cliniques permettra par la suite de déterminer les substances et doses pharmacologiques susceptibles d'être une alternative aux traitements proposés aux patients migraineux.

Pour respecter la règle des 3R,

Remplacer : L'intégration de la douleur implique de nombreuses régions du système nerveux central et périphérique nécessitant des études in vivo sur l'animal qui ne peut être remplacé par des méthodes alternatives pour l'heure.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum. Le nombre d'animaux dans cette étude tient compte des animaux non répondeurs dans notre modèle mais reste suffisant pour détecter un effet significatif entre les traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non). Au total 260 rats seront nécessaires à la réalisation de ce projet. Ils seront mis à mort à la fin des procédures par overdose d'anesthésique.

Raffiner : Dans ce but, les animaux auront une période d'habitation à l'expérimentateur et aux tests avant de débiter l'étude comportementale. Cette période d'habitation permet de réduire le stress des animaux lors des tests comportementaux. La chirurgie est effectuée sous anesthésie générale (chloral hydrate, 400 mg/kg), les animaux sont placés sur une couverture chauffante pendant le temps de la chirurgie et leur cornée est protégée par une couche de vaseline. Le temps de chirurgie est optimisé au maximum pour qu'il dure le moins longtemps possible. Les animaux sont gardés dans la pièce de chirurgie en observation jusqu'à leur réveil complet. D'après les études précédentes, notre modèle animal n'entraîne pas de dommages tissulaires. Les dommages attendus, mis en évidence précédemment dans notre modèle, sont une douleur céphalique utilisée pour modéliser la crise de migraine.

12776 La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par des troubles cognitifs et psycho-comportementaux entraînant une perte d'autonomie. Avec le vieillissement de la population, cette maladie représente un véritable enjeu scientifique, humain, social et économique. Dans des études antérieures, par des études d'association génétique, l'équipe a identifié que le taux d'expression du gène *Nxn12* était un facteur de prédisposition à la maladie d'Alzheimer.

Dans la présente étude, nous nous proposons de déterminer le profil d'expression du gène *Nxn12* dans des régions spécifiques du cerveau (cortex, hippocampe) et de regarder s'il existe un parallèle entre les troubles comportementaux et la mort des cellules qui n'expriment plus *Nxn12*. Ces études seront réalisées sur une lignée de souris transgénique possédant un gène rapporteur permettant de visualiser par test colorimétrique les cellules d'intérêt : souris *Nxn12* KI. Cette souris est passée du modèle d'étude de la signalisation *RdCVF2*, à celui de modèle de la maladie d'Alzheimer avec un déficit mnésique à 2 mois d'âge suivi par une tauopathie à 18 mois, ce qui est unique pour les modèles murins de cette maladie.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'histologie, l'expression tissulaire d'un gène, l'impact sur le comportement de la déficience d'un gène, ne peut être étudié qu'in vivo sur l'animal. Il n'existe pas de méthodes alternatives pour l'heure.

Réduire : Au total, 300 animaux seront nécessaires pour cette étude. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus

Raffiner : Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12777 La surdité liée aux mutations du gène de la cochline est une des formes les plus fréquentes de surdité génétique. De nombreuses preuves expérimentales tendent à montrer que la protéine cochline mutée ne peut être dégradée et s'accumule dans l'oreille interne, provoquant ainsi la mort des cellules nécessaires à la perception auditive. Aucun modèle animal à ce jour n'a pu obtenir de

résultats proches de ce qui est observé chez l'Homme. Cela peut s'expliquer par le fait que des stratégies de mutation qui reproduisent à l'identique la mutation humaine ne permet pas une accumulation suffisante de protéines chez des animaux comme les souris dont l'espérance de vie est limitée. Aussi nous proposons de développer un nouveau modèle de souris mutante, avec une expression accrue d'une mutation humaine provoquant une apparition plus rapide de la surdité. Aussi nous espérons voir apparaître une surdité plus précoce chez la souris et envisager de nouvelles possibilités de traitements. L'existence d'une surdité chez la souris mutante sera étudiée par mesure des potentiels évoqués auditifs et des otoémissions acoustiques depuis la maturation fonctionnelle du système auditif, puis de façon hebdomadaire pendant 2 mois, puis de façon mensuelle. Les mêmes animaux (20 mâles et 20 femelles) seront ainsi testés à différents stades au cours de leur vie.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'étude de l'effet d'une mutation déjà connue chez l'Homme sur la fonction auditive chez l'animal nécessite l'emploi d'animaux vivants, et ne peut être remplacée par d'autres modèles comme la culture cellulaire pour obtenir un modèle utilisable en thérapie.

Réduire : Le nombre de 40 animaux est nécessaire et suffisant pour montrer une différence de perception auditive entre ces souris mutantes et des abaque d'audition de souris ayant le même fond génétique. Cette méthode d'évaluation de la fonction auditive est identique à celle utilisée chez l'Homme et sera donc un bon indicateur prédictif de surdité chez les animaux testés. Si les souris mutantes testées présentent une surdité précoce, elles seront euthanasiées à des âges différents pour faire une étude des tissus de l'oreille interne et observer les anomalies liées à cette mutation.

Raffiner : Durant toute la période d'étude, les animaux seront élevés dans un environnement enrichi : copeaux dans les litières et de rouleaux de papier, abris en plastique pour les reproductions. Pour les manipulations quotidiennes, telle que le change, les animaux seront progressivement habitués à la présence humaine grâce à des contacts réguliers sans geste potentiellement générateur de stress. Tout geste stressant ou douloureux sera entourée d'une anesthésie et d'une analgésie. Leur état de santé sera observé quotidiennement. En cas de perte majeure d'activité locomotrice, d'amaigrissement de 10% du poids, d'infections sévères, ou des signes évidents de douleurs (prostration, automutilation,), les animaux seront euthanasiés afin d'éviter toutes souffrances inutiles.

12778 La peur est une réponse adaptative et transitoire exprimée lorsqu'un sujet est exposé à un danger. Cependant, la peur peut devenir élevée et continue en absence de danger, devenant alors un trouble psychiatrique dénommé anxiété. Cette pathologie constitue la condition psychiatrique possédant la plus forte prévalence. Selon un rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) de 2007, 10,7% des hommes et 14,5% des femmes en France présentent des troubles d'anxiété généralisés. L'anxiété représente ainsi un coût sociétal et économique majeur.

Bien qu'une hypothèse propose que des dysfonctionnements des circuits de la peur soient la cause de l'anxiété, les substrats neuraux à l'origine de l'anxiété et de ses réponses comportementales et physiologiques demeurent incertains. De plus, les traitements actuels existants ne sont pas satisfaisants pour une partie de la population, et présentent des effets secondaires graves comme la génération d'une dépendance.

Le projet vise ainsi à définir l'implication des récepteurs neuronaux ciblés par les traitements actuels dans les troubles anxieux, au travers de l'étude d'une région cérébrale spécifique impliquée dans ces troubles chez l'humain : le cortex insulaire.

Au travers d'analyses de la connectivité et de manipulation de l'activité neuronale chez la souris, nous avons pour objectif de mettre en évidence les altérations des circuits de la peur dans un modèle d'anxiété.

Nous nous proposons également d'étudier les effets d'une molécule (psilocybine) à effets anxiolytiques, sur le circuit neuronal de l'anxiété.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Le projet porte sur une analyse de la connexion des neurones et de leurs propriétés de transmission d'informations au cours du comportement. Par conséquent cette procédure doit être effectuée chez des animaux vivants. Des méthodes telles que la culture cellulaire, ne permettent pas la quantification des connexions neuronales ou la mesure de l'activité en réponse à une stimulation sensorielle in vivo.

Réduire : Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux afin d'obtenir une analyse fiable (le nombre d'animaux estimé permet d'effectuer des tests statistiques) et complète de la connectivité et de l'activité de la population neuronale d'étude. Nous utiliserons ainsi 3600 souris sur cinq ans.

Raffiner : Avant la mise en place du modèle d'anxiété, les animaux seront hébergés en cages collectives, afin de limiter le stress dû à l'isolement. Les cages seront également enrichies en nids en coton. Une surveillance particulière sera adressée aux animaux en période péri-opératoire. L'acte chirurgical sera effectué, sous anesthésie et antalgie et dans des conditions d'asepsie maximales. Des antibiotiques et analgésiques seront administrés en cas d'infection ou de douleur. Des points limites précoces seront définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12779 La lutte contre les bactéries pathogènes et multi-résistantes est un enjeu majeur pour la santé humaine et animale. Le tractus gastro-intestinal est un réservoir de pathogènes opportunistes appelés pathobiontes, qui profitent du déséquilibre du microbiote intestinal pour proliférer dans l'intestin et d'un affaiblissement des défenses immunitaires de l'hôte pour devenir infectieux. *Enterococcus faecalis* est une bactérie commensale sous-dominante du microbiote adulte humain et murin. Cette bactérie ne représente en effet que 0,4 à 1 % du microbiote total. Bien qu'inoffensive pour les individus sains, *E. faecalis* est à l'origine d'un nombre croissant d'infections opportunistes chez des personnes immunodéprimées ou affaiblies. Elle représente une cause majeure d'infections nosocomiales très fréquemment associées à un dérèglement du microbiote.

Les recherches de notre équipe portent sur l'étude de la pathogénie de *E. faecalis* dans le contexte du microbiote intestinal. L'objectif de l'équipe porte sur la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui permettent à *E. faecalis* de proliférer au niveau intestinal et de se propager dans l'hôte. Nous poursuivons plusieurs axes de recherche : 1/ Nous cherchons à identifier des souches commensales renforçant l'effet protecteur du microbiote pour empêcher la colonisation intestinale par *E. faecalis*, 2/ Nous cherchons à caractériser les mécanismes cellulaires qui permettent à *E. faecalis* de traverser la barrière intestinale et de se propager vers d'autres organes en analysant les interactions entre *E. faecalis* et les cellules de l'hôte, 3/ Nous cherchons à identifier les déterminants de *E. faecalis* qui jouent un rôle dans l'infection. Nous avons sélectionné plusieurs gènes candidats pouvant coder des facteurs de pathogénicité dont le rôle doit être déterminé.

Afin de caractériser les mécanismes par lesquels *E. faecalis* est capable dans certaines conditions d'exploiter les déséquilibres du microbiote intestinal pour envahir et infecter l'organisme, nous utilisons différents types de modèles. En première intention, nous utilisons des approches de microbiologie classique sur *E. faecalis* et des modèles simplifiés de microbiologie cellulaire où *E. faecalis* interagit avec des cellules humaines ou murines en culture. Nous utilisons également des approches d'expérimentation animale chez la souris lorsqu'il s'agit d'étudier l'infection de *E. faecalis* dans un modèle complexe c'est-à-dire à l'aide de modèles qui prennent en compte les interactions complexes entre 3 composantes : « le pathobionte », « l'hôte » et « le microbiote intestinal », qui ensemble définissent le pathobiome. *E. faecalis* est notre objet d'étude principal en qualité de pathobionte. Alternativement, d'autres pathobiontes intestinaux sont étudiés : *Enterococcus faecium*, la seconde espèce reconnue comme pathogène pour l'homme et *Klebsiella pneumoniae* un autre modèle de pathobionte intestinal.

Nos approches expérimentales in vivo chez le modèle murin comprennent différents types de modèles parmi lesquels des modèles permettent de décrire et caractériser les mécanismes à l'origine de l'infection. Le modèle de colonisation et de traversée de la barrière intestinale permet de mimer une dysbiose suite à un traitement antibiotique à la suite de laquelle le pathobionte est

capable de coloniser le microbiote intestinal en devenant majoritaire et d'atteindre un seuil à partir duquel les bactéries pathobiontes traversent le tissu intestinal pour atteindre la circulation sanguine et disséminer vers d'autres organes. Ce modèle permet d'étudier les mécanismes de colonisation et de traversée des intestins qui conduisent à l'infection. D'autres modèles permettent de caractériser et de comparer le rôle de facteurs bactériens. Dans ces modèles d'infectivité et de virulence, l'objectif est de comparer des souches entre elles afin de déterminer si l'origine de la souche affecte sa capacité à infecter ou de caractériser le rôle d'un facteur bactérien dans le cas de souches isogéniques qui possèdent le même génome mais expriment ou non ce facteur.

Les résultats de ce projet seront importants pour générer des connaissances afin de développer des méthodes de diagnostic et de nouvelles stratégies pour contrôler les agents pathogènes multi-résistants.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'ensemble de ces approches expérimentales in vivo permettent d'intégrer la complexité des interactions entre le microbiote intestinal, l'hôte et le pathogène. A ce jour, aucune approche in vitro n'est disponible pour remplacer ce type de modèle et « mimer » ces interactions.

Réduire : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous porterons une attention particulière à la reproductibilité des expériences. L'ensemble du projet nécessitera 1500 souris soit en moyenne 300 souris par an.

Raffiner : Nous veillerons à ce que la réalisation de ce projet soit conforme aux exigences de raffinement liées à l'expérimentation animale. Les souris seront hébergées en groupes sociaux, ne seront pas soumises à de longues périodes de jeûne pendant la durée de l'expérience. Pour limiter les contraintes que les animaux subissent au cours des procédures expérimentales, les animaux seront anesthésiés avant les injections lorsqu'il n'y aura pas de contre-indication pour l'interprétation scientifique. A l'exception du modèle de virulence, nous utiliserons des doses sub-létales d'infection, il est donc peu probable que cela soit à l'origine de symptômes sévères. Néanmoins, nous suivrons les différents indicateurs (poids, léthargie...) pour évaluer la proximité de points limites..

12780 La neuromyélie optique est une maladie auto-immune rare proche de la sclérose en plaque caractérisée par une dégénérescence du nerf optique et une paralysie par atteinte de la moelle épinière. Ce projet de recherche appliquée d'une durée de 5 ans vise à comprendre les mécanismes biologiques liés à cette maladie, ainsi que de tester un nouveau traitement thérapeutique chez l'animal. Un modèle expérimental de cette maladie a été développé chez le rat, il consiste en une infusion chronique d'auto-anticorps de patients atteints de la maladie. Les résultats in vitro (étude sur tranche de cerveau) ont mis en évidence une altération fonctionnelle astrocytaire, cette altération peut être bloquée après injection d'une substance pharmacologique qui bloque la communication entre ces cellules. Les objectifs de ce projet sont de poursuivre l'étude de cette maladie et de l'effet de ce traitement in vivo.

Deux techniques seront utilisées. L'activité neuronale et astrocytaire sera enregistrée au microscope bi-photon chez des animaux injectés avec un virus permettant l'expression d'un marqueur d'activité fluorescent, le calcium. L'activité électrophysiologique neuronale évoquée sera aussi enregistrée à l'aide l'électrodes qui seront descendue dans le cortex visuel. Ces enregistrements in vivo seront essentiels pour suivre les changements d'activité de ces cellules du cortex visuels au cours de l'évolution de la maladie et observer les effets de la substance pharmacologique.

Ce projet respecte la règle des 3 R :

Remplacer : Les mécanismes de cette maladie sont inconnus et ne peuvent donc pas être modélisés de manière théorique. De nombreuses études ont été effectuées sur culture primaire (in vitro) pour déterminer les mécanismes cellulaires, cependant, dans une approche préclinique, il est essentiel d'utiliser un modèle in vivo. Ce modèle rat a été développé depuis quelque années avec succès.

Réduire : Un nombre total de 104 animaux sera utilisé pour ce projet. Le nombre d'animaux nécessaire à l'étude a été calculé à partir des résultats des études précédentes. Afin de mieux

suivre l'évolution de la maladie, chaque animal est son propre contrôle ce qui nous permet de réduire le nombre de groupes d'animaux utilisés.

Raffiner : Plusieurs gestes chirurgicaux sont nécessaires afin de réaliser cette étude : l'injection de virus, l'implantation d'une fenêtre optique, d'électrodes et d'une mini-pompe implantée sous la peau de l'animal qui permettra de délivrer des anticorps humains de façon chronique. Les animaux sont anesthésiés et analgésiés pendant les chirurgies et reçoivent 2 doses d'analgésique pendant 2 jours après chaque chirurgie. La durée du protocole d'injection des anticorps humains nous permet de détecter les premiers symptômes de la maladie (atteintes motrices et sensorielles) avant qu'ils ne soient trop prononcés. Sans analyse poussée de notre part, ces troubles ne sont pas détectables par simple observation des animaux dans leur cage, ils ne présentent pas de signes de souffrance et se nourrissent et se comportent normalement. Le degré de sévérité du projet est modéré. L'état des animaux est surveillé quotidiennement. Si les animaux présentent des signes de souffrance, des traitements seront mis en place avec le vétérinaire référent (les signes de douleur et/ou de mal être tel qu'une réduction de poids, un comportement exploratoire diminué, des vocalisations, un comportement de fuite ou de défense à la manipulation sont surveillés). Si ces signes de mal être persistent plus de 24h, l'animal sera euthanasié, une grille de score est utilisée afin d'évaluer ces signes. A la fin des procédures les animaux sont euthanasiés.

12781 Les rayonnements ionisants sont à ce jour un outil incontournable de l'arsenal thérapeutique de la cancérologie. En France, chaque année, 60% des cancers sont traités par radiothérapie externe soit environ 180 000 patients. Les pratiques de radiothérapie en routine imposent l'optimisation des doses délivrées au volume tumoral cible de façon à obtenir la meilleure efficacité thérapeutique possible tout en réduisant « autant que possible » la dose délivrée au tissu sain environnant la tumeur et assurer ainsi la qualité du traitement. Malgré les nombreux progrès dans ce domaine, il est important de noter que la radiothérapie s'accompagne fréquemment d'effets secondaires en raison de la présence de tissus normaux dans le champ d'irradiation. Certains de ces effets disparaissent spontanément alors que d'autres apparaissent de façon inéluctable. La toxicité radio-induite aux tissus sains est donc un facteur limitant dans l'escalade de dose pouvant être délivrée à la tumeur. Cependant, sa sévérité peut affecter la qualité de vie des survivants du cancer qui sont de plus en plus nombreux. Cinq ans après traitement, 5 à 10 % des patients développent encore des complications tardives plus ou moins sévères de leur radiothérapie, soit un nombre de patients estimé en France entre 9 000 et 18 000 par an. Bien que cette technique présente un niveau de sécurité élevé, les incidents et accidents de radiothérapie survenus ces 5 dernières années rappellent que la radiothérapie, si elle est insuffisamment maîtrisée, peut conduire à des conséquences graves pour la santé des patients.

L'objectif de cette étude sera de développer une stratégie thérapeutique innovante afin de traiter la cystite radique suite à l'application d'un protocole de radiothérapie. Cette étude vise particulièrement à apporter des preuves de concept précliniques de l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) pour le traitement de la cystite radique. Après vérification de la qualité des CSM, des rats seront soumis à une irradiation locale au niveau de la vessie puis traités par injections locales de cellules souches (CSM) dans la paroi de la vessie. Les effets de l'irradiation seront suivis à long terme (jusqu'à 12 mois). La dose d'irradiation sera minimisée afin de limiter les effets secondaires sur l'animal. L'effet de la thérapie cellulaire sur les animaux irradiés sera ainsi comparé aux séquelles observées chez les animaux non traités.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Pour évaluer l'effet de la CSM sur les lésions de la vessie nécessite un modèle intégré in vivo, Les modèles in vitro comme les organoïdes de vessie ne sont pas stable pour un suivi chronique et ne permettent pas les phénomènes de recircularisation des CSMs.

Réduire : Au total 600 rats seront nécessaires à l'aboutissement de ces expérimentations. Le nombre d'animaux est basé sur le nombre statistique d'animaux nécessaire par groupe et sur l'expérience du laboratoire sur les procédures d'irradiation.

Raffiner : Les animaux seront suivis tout au long des procédures expérimentales afin de respecter les points limites spécifiques et limiter toute souffrance ou douleur. Les animaux seront anesthésiés pour les procédures d'irradiation et d'administration locale quand nécessaire.

12782 Le TRALI (Transfusion-Related Acute Lung Injury) est un œdème lésionnel pulmonaire survenant quelques heures après une transfusion de produits sanguins labiles. Bien qu'il s'agisse d'un événement rare, il reste une des premières causes résiduelles de mortalité transfusionnelle. Le TRALI est provoqué le plus souvent par la présence dans les produits transfusés d'anticorps de type immunoglobulines G (IgG) qui se lient, par leur partie dite « variable », à des molécules d'histocompatibilité de classe I (MHC I chez la souris, HLA I chez l'homme) ou de classe II présentes sur les cellules endothéliales des vaisseaux ou sur les globules blancs, provoquant l'œdème à l'origine de la détresse respiratoire. En raison de sa rareté, les observations cliniques sont difficilement exploitables. Les mécanismes cellulaires participant au développement du TRALI sont complexes, aussi, sa compréhension requiert des explorations expérimentales complémentaires in vitro et, in vivo dans des modèles animaux. Les mécanismes moléculaires et cellulaires qui conduisent au TRALI ne sont pas encore bien compris, même si l'intervention des plaquettes, des neutrophiles et des macrophages est suspectée. En particulier, on ne connaît pas le rôle que pourraient jouer les récepteurs spécifiques des IgG. Les IgG, en se liant par leur partie dite « constante » à ces récepteurs spécifiques présents sur les cellules de types leucocytes et plaquettes, provoquent une activation forte de ces cellules. Ces récepteurs pourraient donc être potentiellement impliqués dans le TRALI.

Notre projet vise à évaluer le rôle des récepteurs aux IgG dans le TRALI. Nous utiliserons un modèle de TRALI chez la souris. Dans ce modèle, les souris sont pré-sensibilisées avec une injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide suivie, 24 heures après, d'une injection, sous anesthésie générale, de l'anticorps anti-MHCI qui déclenche le TRALI. Les souris anesthésiées, développent alors un œdème pulmonaire et une détresse respiratoire dans les 2 heures. Ce modèle permet de pouvoir prélever des échantillons biologiques (organes, sang, lavages broncho-alvéolaires) sur lesquels on examinera le niveau d'activation des cellules sanguines (plaquettes, globules blancs), l'infiltration des globules blancs dans les organes ainsi que la formation d'œdèmes. Ces travaux nous permettront de déterminer si les récepteurs aux IgG jouent un rôle dans le TRALI et de déterminer les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués. Ces récepteurs pourraient constituer une nouvelle cible d'intérêt pour inhiber la réaction de TRALI.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Le recours à l'utilisation d'animaux est justifié par le fait que les mécanismes cellulaires et moléculaires de TRALI sont difficiles, voire impossible à étudier chez l'homme, vue l'imprévisibilité de l'évènement et sa rareté. Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront réduites au minimum et complétées par des études in vitro sur cellules (tests d'activation cellulaire).

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Une analyse de variances de type ANOVA avec un post-test Bonferroni sera réalisée entre les groupes. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire et dans la mesure du possible, dans les expériences qui l'exigent, le sang et les tissus seront prélevés sur les mêmes animaux. Ce projet nécessitera 2826 souris au maximum

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure de papier pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture.

Lors de la procédure d'injection intraveineuse (rétro orbitaire), les souris sont anesthésiées au vetflurane® et maintenues au chaud à 37°C sur une couverture chauffante thermostatée. Une goutte d'antalyre, un collyre anti-inflammatoire contenant de l'acide salicylique et de l'acide borique est ensuite appliqué sur l'œil de l'animal pour éviter son dessèchement.

L'expérience de TRALI est réalisée sous anesthésie générale et a une durée maximale de deux heures. A la fin de l'expérimentation, les animaux sont mis à mort avant leur réveil.

12783 Le but de ce projet est de former, entraîner et/ou ré-entraîner les utilisateurs à la réalisation/maîtrise de techniques d'administration et de prélèvement.

Cette formation/réentraînement s'adresse aux concepteurs et aux personnels appliquant des procédures expérimentales, détenteurs d'un niveau concepteur ou réalisateur en expérimentation animale et souhaitant être encadrés pour la réalisation de certains gestes techniques afin d'apprendre à travailler en totale autonomie et en aisance technique.

Les gestes expérimentaux seront (i) administration d'un composé en voie SC sous-cutané (SC), en intramusculaire (IM), en intradermale (ID), en (intrapéritonéale (IP), en intraveineuse (IV) (veine de la queue, sinus rétro-orbitale), (ii) administration d'un composé par voie orale (gavage), administration d'un composé par voie intra tibiale, (iii) effectuer des prélèvements de sang, d'urine, de liquide céphalo rachidien (LCR), de bile.

Conformité/exigences de la règle des 3R:

Remplacer: La formation aux bons gestes techniques permettant ensuite de raffiner et de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les projets scientifiques ne peut pas être réalisée autrement que sur l'animal.

Réduire: Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en permettant la répétition des actes expérimentaux dans le respect des volumes tolérés pour chaque utilisateur. 400 animaux seront utilisés au maximum dans ce projet (200 souris et 200 rats).

Raffiner: Pendant toute la période précédant la mise en œuvre du projet, les animaux auront reçu un enrichissement adapté. Les animaux utilisés seront issus d'élevages et destinés à l'euthanasie (animaux surnuméraires: sexe et génotype en inadéquation avec les projets en cours, animaux reproducteurs trop âgés). Les procédures seront sans réveil. Les animaux seront anesthésiés (générale +locale) et analgésiés (analgésiques centraux) et mis sur tapis chauffants. Cependant, les administrations d'un composé par voie IV (veine de la queue) et par voie orale (gavage) pourront être pratiquées sur animaux vigiles et dans le cadre d'une procédure classée légère.

12784 L'objet de cette demande d'autorisation de projet est d'étudier le rôle dans la perception de la douleur chez la souris, de mutations qui ont été identifiées comme impliquées dans les syndromes douloureux chroniques. Ces mutations sont présentes dans deux gènes voisins, et causent des douleurs intenses et spontanées telles que des sensations de brûlure et de démangeaisons au niveau des bras et des jambes. Jusqu'à maintenant les traitements prescrits aux patients restent très peu efficaces, ce qui nécessite d'effectuer des recherches plus avancées dans le but de mieux comprendre l'effet de ces mutations sur la nociception. La grande similarité entre les systèmes nerveux qui contrôlent la douleur chez la souris et chez l'homme fait du modèle souris un modèle idéal pour l'étude de ces maladies et pour comprendre les phénomènes biologiques qui y sont associés.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Dans le but de remplacer l'utilisation des souris, des méthodes alternatives ont été effectuées antérieurement et ont montré que ces mutations induisent un fonctionnement trop important des protéines codées par ces gènes. Ceci suggère que ces protéines mutées qui fonctionnent de manière excessive sont responsables des hypersensibilités chez les malades. Et maintenant pour aller plus loin, les capacités sensorielles ne peuvent pas être évaluées seulement par des études in vitro, mais nécessite d'être évaluées dans des modèles de souris, nécessitant l'utilisation d'animaux.

Réduire : Nous utiliserons 1656 souris au total. Cet effectif est approprié pour les études comportementales sur les souris mutées pour ces deux gènes et est suffisant pour montrer une différence statistique entre les groupes mutés et non mutés, si elle existe. En effet ce nombre est calculé pour détecter une différence de 20% avec une variation vers augmentation de la sensibilité douloureuse, et les expériences effectuées dans deux cohortes indépendantes afin de vérifier la reproductibilité des résultats de ces expériences de comportement. Pour minimiser le nombre de souris utilisées, les différents tests seront réalisés sur les mêmes souris.

Raffiner : La souris est de nos jours le modèle de choix largement utilisé pour l'évaluation des mutations humaines dans des modèles de rongeurs. La création de souris mutantes par le nouveau système génétique qu'on utilise est plus avancée chez la souris que chez le rat, et notre projet est financé par un contrat européen pour la création des mutations chez la souris. Le bien-être des souris sera assuré tout au long de l'étude avec un suivi régulier de la boisson, la nourriture et de l'état de ces souris. Le phénotype de ces souris mutantes n'est pas encore connu puisque leur étude n'a pas été publiée jusqu'à présent, cependant afin d'éviter toute souffrance inutile, les souris feront l'objet d'un suivi rapproché et des points limites éthiques et des critères d'arrêt sont définis. Les animaux seront euthanasiés en cas d'une perte de poids supérieure à 20% et/ou de critères de souffrance importante.

12785 La chimiothérapie est utilisée dans le traitement de nombreux cancers. Les agents chimiothérapeutiques classiques ont une action bien connue sur les cellules cancéreuses, cependant à cause de leur administration générale dans tout l'organisme, ils sont également actifs sur toutes les autres cellules du corps, notamment celles du système immunitaire. L'effet de ces agents sur le système immunitaire dans un contexte tumoral n'est pas connu. Avec l'essor de nouveaux traitements comme ceux visant à utiliser le système immunitaire contre le cancer, cette question apparaît essentielle pour l'utilisation maîtrisée de traitements combinés dans la prise en charge des cancers. En conséquence nous proposons un projet de recherche fondamental et translationnel permettant de mesurer l'effet d'une chimiothérapie sur le système immunitaire chez des souris qui développent spontanément un cancer de la glande mammaire.

La réalisation du projet s'attache à respecter la règle des 3R.

Remplacer : Des expériences préliminaires ont été réalisées au laboratoire et l'examen de la littérature a permis de remplacer en amont le recours à l'utilisation de modèles murins. Néanmoins, il est impossible d'étudier les interactions entre les systèmes immunitaire et les tumeurs avec des approches « in vitro » uniquement. .

Réduire : Les souris utilisées développent toutes des tumeurs ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude et l'ensemble des organes concernés (rate, ganglions et tumeurs) seront prélevés et analysés sur les mêmes animaux ce qui permet d'optimiser l'étude. L'ensemble de l'étude comportera 148 animaux.

Raffiner : Le projet est organisé en deux étapes, une étude pilote avec le suivi longitudinal d'une petite cohorte d'animaux qui permettra d'établir les conditions optimales du traitement à administrer. Cette étude sera suivie dans une deuxième étape d'un protocole optimisé en termes de traitement et de durée permettant ainsi le raffinement de l'étude. La lignée étudiée développe spontanément des tumeurs de la glande mammaire, selon une cinétique très bien documentée dans la littérature. Ces tumeurs se développent sous l'influence des hormones femelles après la puberté. La lignée est maintenue par les mâles qui ne développent pas de tumeurs. Ensuite, concernant les souris femelles, les croisements permettant de générer les animaux étudiés sont synchronisés de manière à générer des cohortes de même âge et à ce que toutes les souris soient étudiées. Les animaux étudiés sont des femelles qui sont suivies et observées tous les jours. La présence de tumeurs sera contrôlée deux fois par semaine dès l'âge de 5 semaines par un examen clinique vérifiant que la maladie n'entrave pas le bien-être de l'animal. Nous n'attendons pas de tumeurs volumineuses dans la fenêtre d'âge choisie pour l'étude. Cependant si des animaux présentent une tumeur d'une taille supérieure à 20 mm, ils seront euthanasiés par une méthode éthique.

12786 Les vitamines B9 et B12 jouent un rôle essentiel dans la production du matériel génétique (ADN, ARN) et des acides aminés nécessaires à la croissance cellulaire, ce qui explique leur caractère indispensable au cours du développement. Ces micronutriments sont obtenus principalement à partir de légumes à feuilles (B9) et à partir des aliments d'origine animale (B12). La carence nutritionnelle ou due à une maladie acquise ou génétique, peut avoir des conséquences graves sur la santé. Ces conséquences sont plus graves si la carence se produit dans des étapes précoces de la vie. Des études précédentes sur des animaux présentant une déficience en donneurs de méthyle pendant la gestation et l'allaitement, ont montré un faible poids de naissance et une accumulation

de graisses dans le foie et cœur. Ces vitamines sont nécessaires à la production de nouvelles cellules, ce qui les rend particulièrement importantes durant les périodes d'activité métabolique intense comme la grossesse (développement du fœtus), l'enfance et l'adolescence. Des observations faites en 1986 ont montré que les individus nés avec un petit poids de naissance ont un taux de mortalité cardiovasculaire plus élevé une fois atteint l'âge adulte.

Chez la femme, la carence alimentaire en vitamines B9 et 12 pendant la grossesse et l'allaitement est fréquente et induit chez le fœtus des effets de « programmation fœtale » associés aux pathologies chroniques liées à l'âge, notamment métaboliques, hépatiques, myocardiques et neurologiques. L'accumulation sanguine d'homocystéine, marqueur de la carence vitaminique, pourrait contribuer à ces pathologies. Cependant, les manifestations vasculaires et leurs mécanismes moléculaires liés à la programmation fœtale causée par cette carence n'ont pas été étudiés.

Pour comprendre les mécanismes liant la carence maternelle à un défaut de la fonction aortique, nous souhaitons soumettre des rates à un régime carencé en vitamines B9 et B12 un mois avant accouplement, et maintenir ce régime tout au long de la gestation et de l'allaitement. Les rats âgés de 21 jours, âge du sevrage, et nés de mères carencées en vitamines B9 et B12 seront ensuite étudiés au niveau physiologique (mesure de la pression artérielle) puis mis à mort pour doser les marqueurs de la carence et mener une étude sur l'expression des molécules impliquées dans la fonction aortique dans ces conditions de carence.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Il n'existe aucune alternative, ni d'approche in vitro car notre étude porte sur les effets transgénérationnels d'une carence vitaminique, et sur le développement et la physiologie de l'aorte descendante chez le rat âgé de 21 jours, et né de mère carencée en vitamines B9 et B12.

Réduire : Notre étude nécessitera 30 rats adultes géniteurs (10 mâles reproducteurs et 20 femelles dont 16 soumises au régime carencé) et 32 ratons âgés de 21 jours, dont 16 nés de mères soumises au régime carencé. Les mâles et les femelles seront étudiés dans le même temps, et nous constituerons des groupes d'étude à raison de 8 individus par groupe, permettant ainsi l'interprétation scientifique des résultats par des tests statistiques appropriés.

Raffiner : Nous commençons chaque protocole expérimental par une période d'acclimatation de 2 semaines à ce nouvel environnement. Les animaux sont surveillés quotidiennement et une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Le point limite ultime est fixé à 20% de perte du poids corporel (chez les adultes) avec repérage des signes de mal-être définis au préalable par notre vétérinaire référent. En fin de protocole les animaux seront mis à mort et des prélèvements seront effectués (sang, aorte, artère iliaque, cerveau, foie, cœur, estomac, intestin, graisses viscérales) pour permettre des analyses biochimiques et établir les changements métaboliques dans chaque organe. Les mâles reproducteurs, non étudiés, seront replacés dans la mesure du possible.

12787 La dépression touche 100 millions de personnes en Europe chaque année, cependant il n'existe pas aujourd'hui de traitement réellement efficace. C'est pourquoi il est urgent de mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent le développement de la dépression chez certains individus et au contraire, la résilience chez d'autres. Dans ce contexte, notre laboratoire a récemment démontré que chez la souris, une supplémentation en oméga-3 permettait d'augmenter la résistance des animaux face au développement de comportements de type anxieux et dépressifs qui sont induits par un protocole de stress chronique de défaite sociale.

Le protocole de défaite sociale est reconnu pour induire des comportements de type anxieux et dépressifs chez le rongeur et il bénéficie d'une bonne validité éthologique. De plus, ce protocole permet de différencier les animaux en deux sous-populations, car 30 à 50 % d'entre eux sont résilients et ne développent pas de troubles du comportement. Le protocole de stress chronique de défaite sociale permet donc d'étudier dans de bonnes conditions les mécanismes neurobiologiques de la résilience et de la susceptibilité aux troubles anxieux et dépressifs. De plus, après 10 jours

consécutifs de protocole, les phénotypes anxieux persistent dans le temps, jusqu'à 8 semaines après la fin du protocole de stress.

L'objectif de notre projet est désormais d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes neurobiologiques par lesquels les oméga-3 contenus dans l'alimentation permettent de protéger les animaux. L'objectif à long terme de ce projet est de transférer les connaissances acquises chez le rongeur à l'homme pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et nutritionnelles. Ces données précliniques nous permettront de comprendre un peu plus en quoi la nutrition influence les fonctions cognitives et la physiologie de la transmission synaptique. De plus, des applications thérapeutiques peuvent être envisagées, en particulier pour déterminer si une thérapie nutritionnelle peut atténuer les pathologies liées au stress chronique, comme par exemple les troubles de stress post-traumatiques. De façon similaire, des stratégies préventives, liées à une nutrition adaptée et équilibrée en lipides, pourraient être envisagées afin de limiter, réduire ou même d'endiguer l'apparition de troubles dépressifs et/ou anxieux.

Dans ce projet, nous souhaiterions identifier les mécanismes neurobiologiques par lesquels les oméga-3 ont un rôle protecteur dans le développement de la dépression. Plus globalement, nous étudions les relations entre nutrition et fonctions cérébrales. Ce projet, qui se déroulera sur quatre ans, implique la mise en œuvre du protocole de stress chronique de défaite sociale chez des souris mâles adultes C57Bl6/j par des souris Swiss CD1 mâles (anciens reproducteurs). Le protocole de défaite sociale consiste à placer une souris dite "agresseur" en présence d'une souris de plus petit gabarit et pendant 5 minutes. Les souris sont ensuite séparées par une paroi de plexiglass afin de maintenir un contact visuel et olfactif entre les deux souris, pendant 2 heures. L'agression de 5 minutes suivie du contact sensoriel de 2 heures sont répétées pendant 10 jours consécutifs, ce qui constitue le protocole de défaite sociale. Ce projet consistera d'abord à mettre les souris sous différents régimes alimentaires, pendant 8 semaines, puis la mise en place du protocole de défaite sociale. Ensuite, des tests de comportement seront réalisés, suivis d'une séance d'imagerie (IRM). Enfin, les souris seront euthanasiées afin de réaliser des prélèvements de tissus ainsi que des enregistrements d'activités électriques dans le cerveau.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Ce protocole ne peut être remplacé par des études in vitro ou ex vivo, en raison des composantes cognitives requises pour un parallélisme à minima des pathologies humaines (dépression et/ou anxiété).

Réduire : En minimisant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et atteindre une signification statistique, tout en respectant la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement), nous estimons que 12 animaux par groupe expérimental seront nécessaires pour obtenir des puissances statistiques suffisantes. Nous utiliserons pour cela un total de 1728 animaux, dont 1368 sont des souris C57Bl6/j et 360 sont des souris Swiss CD1. ;

Les souris Swiss CD1 agresseurs seront employées durant deux sessions consécutives de défaites sociales. A la fin des deux protocoles successifs, les CD1 seront proposées aux autres utilisateurs puisqu'elles n'auront pas reçu de traitements particuliers, sinon elles seront euthanasiées.

Raffiner : Une attention particulière sera portée aux animaux subissant la défaite sociale pour que leurs conditions de vie soient les meilleurs possibles en dehors du développement de troubles anxieux et dépressifs. Les souris C57Bl6/j seront hébergées par paires, conformément à la réglementation en vigueur. La souffrance et la douleur seront étroitement surveillées en dehors du protocole de défaite sociale. Si une souris est blessée, elle sera soignée (désinfection et Tolfédine (analgésique) à 0.4 mg/kg) et surveillée par la suite. Si les souffrances atteignent des points limites ultimes, définis au préalable, alors les animaux seront euthanasiés.

12788 Le but de ce projet est de créer et de caractériser un modèle animal qui présente une réduction de l'expression de la dynamine 2 musculaire, et d'étudier l'éventuelle efficacité thérapeutique que celle-ci pourrait avoir pour la myopathie centronucléaire. La myopathie centronucléaire est une maladie rare sévère caractérisée par une importante faiblesse. Pour comprendre le rôle physiologique des gènes impliqués dans le muscle, nous avons dans un premier temps utilisé des expériences in vitro

(REMPACEMENT). Nous planifions maintenant d'utiliser des souris pour comprendre à la fois la physiologie et la pathophysiologie in vivo. Dans le but de mieux comprendre les fonctions des protéines impliquées dans ces pathologies et leurs interactions, dans le muscle sain et pendant le développement des pathologies, nous prévoyons d'utiliser un modèle de souris qui n'exprime pas la dynamine 2 musculaire qui est spécifiquement exprimée dans le muscle et est impliquée dans la myopathie centronucléaire. L'utilisation de ce modèle souris est indispensable pour comprendre la physiopathologie in vivo.

Nous avons précédemment montré qu'un niveau trop élevé de la dynamine 2 dans le muscle semblait jouer un rôle majeur dans la survenue de certaines myopathies. Nous avons développé deux approches utilisant d'une part un croisement génétique dans le but de diminuer l'expression de dynamine 2 de 50%, et d'autre part une approche thérapeutique utilisant un composé injectable capable aussi de diminuer le niveau de dynamine 2. Chez des souris malades exprimant 50% de dynamine 2 ou injectées avec le composé, nous avons obtenu leur rétablissement quasi-total sur l'ensemble des signes cliniques de la maladie, et l'allongement de leur durée de vie. La dynamine 2 est exprimée dans tout l'organisme mais il y a un type de dynamine 2 exprimé de façon spécifique dans le muscle. Notre but est d'une part déterminer le rôle de ce type de dynamine 2 musculaire, et d'autre part étudier sa possible utilisation comme cible thérapeutique contre la myopathie centronucléaire pour éviter tout possible effet secondaire de la diminution de la dynamine 2 sur d'autres organes.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Nous avons préalablement étudié l'effet de l'isoforme de la dynamine 2 dans des modèles cellulaires pour réduire au maximum le nombre d'animaux mais seulement le modèle murin nous permet d'observer son rôle sur la maturation et structure du muscle ainsi que pour déterminer son effet thérapeutique contre la myopathie centronucléaire Réduire : Plusieurs procédures expérimentales (PE) (maximum une PE/jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris. 15 souris seront utilisées pour chaque expérience. 15 souris maximum / groupe seront utilisées pour s'assurer que l'étude soit statistiquement et scientifiquement valable. Un maximum de 1643 souris sera utilisé. En effet, le projet s'articule en 3 séquences. Selon les résultats de la première séquence, nous poursuivrons ou non les expériences des 2 séquences suivantes.

Raffiner : Afin de préserver le bien-être des animaux, les souris seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur ou inconfort sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur ou inconfort observé (soit modification dans l'alimentation pour une nourriture en gel, soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront sortis de l'étude).

12789 Le Raton laveur est une espèce exotique envahissante, en pleine expansion sur le territoire français, et qui pourrait constituer une réelle menace pour la biodiversité locale du fait de son mode vie généraliste et de l'absence de prédateurs naturels. A notre connaissance, aucune étude scientifique sur l'espèce n'est encore parue à ce jour en France alors que l'apport de connaissances sur le Raton laveur dans son nouveau milieu constitue une étape indispensable à une meilleure évaluation des risques et une meilleure gestion des populations. Le présent projet vise ainsi à acquérir les premières données sur l'éco-éthologie, le régime alimentaire et le statut sanitaire du Raton laveur en France via la combinaison de plusieurs outils et méthodes de collecte et d'analyses de données. Ce projet, d'une durée de 3 ans, sera mené sur 4 sites d'études. Deux sites sont positionnés dans les départements de la Marne et des Ardennes, zone particulièrement intéressante du fait de sa localisation entre deux fronts de colonisation et de la forte densité de Ratons laveurs dans ce secteur. Les deux autres sites sont localisés en Aquitaine. L'un de ces sites se situe en Gironde et abrite le noyau dynamique de population de Ratons laveurs en Aquitaine. L'autre site, localisé en Charente, représente l'un des derniers bastions de population du Vison d'Europe, espèce en danger critique d'extinction.

Le premier volet du projet se consacrera à l'étude de l'organisation spatiale et des déplacements des individus. Ce travail sera basé sur le suivi des déplacements de 45 ratons laveurs par collier

GPS (entre 10 et 15 individus dans chacun des sites de Champagne-Ardenne et de Gironde, technique non déployée en Charente du fait du trop faible nombre supposé de rats laveurs). Le deuxième volet vise à étudier les comportements du Raton laveur à fine échelle sur la base de données acquises par un accéléromètre tridimensionnel fixé au collier GPS. Le troisième volet de ce travail porte sur l'étude du régime alimentaire du Raton laveur sur courte et longue période. Il s'appuie sur 2 protocoles : le premier, non-invasif, se base sur la collecte de fèces pour leur analyse biomoléculaire ; le deuxième protocole porte sur l'analyse des ratios isotopiques représentés dans les vibrisses des Rats laveurs. Le quatrième volet s'intéresse à l'étude du statut sanitaire du Raton laveur par le biais d'autopsies d'animaux tués à la chasse ou lors de collisions routières. Le dernier volet vise à l'élaboration et à la validation de systèmes de détection active et précoce spécifiques du Raton laveur : simples tubes appâtés suffisamment profonds pour que seul le Raton laveur puisse atteindre et attraper l'appât. Ce système ne retient pas l'animal. Enfin, des prélèvements génétiques seront réalisées afin d'enrichir la base de données relative à la répartition génétique du Raton laveur en France gérée par l'ONCFS - Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage.

Pour mener à bien ce travail, les Rats laveurs seront capturés à l'aide de cages à palette (30 x 30 x 100 cm), qui enferment l'animal sans le blesser et sans maintenir aucune partie de son corps. Les pièges seront relevés chaque matin à l'aube afin de limiter la durée d'enfermement des animaux. Les individus adultes et en bon état de santé apparents seront ensuite transférés dans une cage de contention puis anesthésiés par voie intramusculaire afin de limiter la souffrance et l'angoisse pouvant être ressenties lors des manipulations. Une fois l'état d'endormissement de l'animal vérifié et confirmé, il lui sera ajusté autour du cou un collier GPS de moins de 200 grammes. Quelques vibrisses lui seront ensuite prélevées à l'aide d'une pince à épiler. Une biopsie sera réalisée à l'oreille à l'aide d'un punch à biopsie en vue de futures analyses génétiques. Enfin, il lui sera posé un transpondeur en sous-cutané afin de permettre son identification en cas de recapture sans collier. Le bien-être des animaux (position ad hoc, couverture pour maintenir la température, humidification des cornées) ainsi que la surveillance de leur état physiologique seront assurés tout au long de la vingtaine de minutes que durent les manipulations. L'ensemble de ces manipulations se dérouleront sur le site de capture, une injection d'antidote lèvera l'anesthésie dès la fin des manipulations et les animaux seront relâchés sur place après leur reprise de vigilance. Au terme de la durée d'enregistrement des données GPS, un mécanisme d'ouverture du collier sera activé à distance et permettra ainsi de libérer l'animal de son collier sans avoir à le capturer de nouveau.

12790 Dans les unités de soins intensifs, de chirurgie et de transplantation, les cliniciens sont très souvent confrontés aux conséquences des épisodes ischémiques, c'est-à-dire le manque d'oxygénation des tissus. Ce phénomène peut se révéler dramatique en termes de récupération fonctionnelle des organes touchés avec parfois une issue fatale pour le patient. Ajouté à cela, le phénomène dit de reperfusion, c'est-à-dire la réoxygénation d'un organe venant de subir une ischémie, est tout aussi problématique pour l'organe et même souvent plus dramatique. Les cliniciens sont actuellement en manque de moyens pharmacologiques pour pallier ces atteintes. En raison du contexte multifactoriel de stress due à l'ischémie/reperfusion.

En partant d'organismes modèles, nous avons identifié une toute nouvelle voie impliquée dans la résistance à l'ischémie chez les espèces animales depuis la mouche jusque chez l'homme. Cette voie fait intervenir un facteur clé de l'initiation de la synthèse de protéine. Nous avons déjà montré in vivo dans des études précédentes que l'inhibition pharmacologique de cette voie chez le rongeur, augmente la tolérance des tissus après un épisode d'ischémie/reperfusion. Chez le cochon, dans un modèle préclinique de transplantation rénale, cette inhibition pharmacologique conduit à une nette amélioration de la récupération fonctionnelle de l'organe greffé à long terme.

L'objectif de notre projet est maintenant de décrypter les mécanismes impliqués dans cette toute nouvelle voie de résistance des organes à l'ischémie/reperfusion pour à terme optimiser les protocoles de transplantation chez l'homme.

Dans ce but, nous devons maintenant expérimenter sur des modèles animaux. En effet, à notre connaissance, il n'existe pas de méthode alternative permettant de répondre à notre problématique en mimant toutes les interactions qui sont mises en jeu dans un organisme entier.

Pour cela, des souris seront prétraitées en injection intrapéritonéale avec le composé pharmacologique inhibant la voie eIF5A ou son véhicule. Ce composé pharmacologique est connu pour ne présenter aucune toxicité chez l'animal.

Ensuite, nous mimerons des épisodes d'ischémie avec ou sans reperfusion, comme rencontrés en clinique, sur plusieurs organes (foie, rein, pancréas), qui seront alors prélevés pour des analyses biochimiques, moléculaires et histologiques.

Ces protocoles nécessiteront 544 souris et se feront sans réveil des animaux après les interventions. Ce projet se justifie pleinement d'un point de vue scientifique et obéit à la règle des 3R:

Remplacement : des expériences in vitro ont été effectuées et il s'agit maintenant de valider in vivo et de façon ciblée les voies dans des modèles animaux incontournables.

Réduction : le nombre de souris a été choisi en suivant une méthode statistique permettant de réduire au maximum tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables pour trouver un effet significatif. Les organes témoins non ischémiés seront issus du même animal.

Raffinement : les animaux sont élevés en milieu enrichi. L'agent pharmacologique que nous injecterons ne présente aucune toxicité. Nos souris sont suivies quotidiennement donc toute apparition de signes de douleur ou d'inflammation entrainera l'ouverture d'une fiche de score avec des points limites identifiés.

12791 Les animaux hébergés dans l'animalerie possèdent un statut sanitaire défini. Le confinement et les règles de circulation au sein de l'animalerie visent à conserver à ces animaux le statut sanitaire initial. Des infections latentes ou déclarées chez l'animal de laboratoire peuvent conduire à une contamination et influencer la santé des animaux en expérimentation, des expérimentateurs et entraîner des répercussions sur les résultats expérimentaux. Ceci obligerait alors à répéter les essais et par conséquent à augmenter l'utilisation d'animaux. Pour éviter ces répétitions, l'utilisation d'animaux sentinelles représentant l'environnement d'une animalerie est nécessaires.

Le programme annuel des contrôles sanitaires prévoit des analyses trimestrielles avec recherche des agents conforme aux recommandations FELASA (bactéries, virus, parasites) présents dans le sang, le pelage, la cavité buccale ou les fèces des animaux. Respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'utilisation d'animaux sentinelle reste une des méthodes incontournables pour la surveillance de l'état sanitaire d'un élevage, en complément d'autres méthodes alternatives.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit au minimum pour respecter l'efficacité du test et la disposition de notre animalerie. Il est estimé à 360 souris sur 5 ans.

Raffiner : Les contrôles sanguins se font par prélèvement de sang sous anesthésie tandis que le contrôle du pelage ou de la cavité buccale se font pas une méthode d'écouvonnage qui est indolore et permet de respecter le bien-être animal. Les animaux sont surveillés quotidiennement, hébergés en milieu enrichi. Des points limites et des critères d'arrêt seront appliqués pour éviter toutes souffrance.

12792 La Lamproie marine (*Petromyzon marinus*) est une des trois espèces de lamproies européennes, toutes en annexe II de la directive habitat faune flore 92/43/CEE et dont les frayères sont également protégées. La préservation efficace de cette espèce implique une estimation fiable des effectifs d'adultes qui se reproduisent en rivière. Elle est par ailleurs une ressource halieutique exploitée notamment dans les rivières en Europe pendant sa migration depuis la mer vers les zones de reproduction. Or, l'exploitation halieutique fournit des indicateurs relatifs d'abondance des populations ciblées, tel le nombre de captures par unité d'effort (CPUE), calculé comme le rapport entre le nombre de captures déclarées et l'effort de pêche (nombre d'engins x jours de pêche, par exemple). Cependant, la CPUE est un indicateur relatif, au sens où il permet de détecter des

variations spatiales ou temporelles de l'effectif, mais pas d'estimer l'effectif lui-même. Pour accéder à cette estimation, il est nécessaire d'estimer aussi la probabilité individuelle de capture, qui correspond au taux d'exploitation par la pêche.

La méthode de capture-marquage-recapture (CMR) permet d'estimer la probabilité individuelle de capture. Cette procédure consiste à capturer des individus, leur apposer une marque visible et les relâcher dans le milieu naturel en aval de la zone de pêche. Les lamproies marquées reprennent leur migration et traversent la zone de pêche, où certaines sont prélevées par des pêcheurs, qui déclarent la recapture d'individus marqués. Le nombre d'individus recapturés divisé par le nombre d'individus initialement marqués donne alors le taux d'exploitation, qui d'une part renseigne sur l'intensité de la pression de pêche, et d'autre part permet de calculer l'effectif de la population. En réalité, le calcul à effectuer est plus complexe car il doit tenir compte de la probabilité que les lamproies meurent après le marquage, perdent leurs marques, ou que les pêcheurs ne déclarent pas toutes leurs recaptures.

Un total de 1 000 lamproies par an sur 3 ans seront acquises auprès de pêcheurs professionnels, dans un système fluvial ou entre 50 000 et 100 000 lamproies marines ont été capturées annuellement au cours des dix dernières années. Chaque pêcheur, sélectionné sur sa capacité à conserver les lamproies vivantes en bon état, apportera les lamproies sur le lieu du lâcher dans un vivier aéré avec un bulleur et une pompe, d'où elles seront sorties une à une. Le lieu de lâcher sera situé en aval de la zone de pêche, et distant au maximum de 50 km du lieu de capture initiale par les pêcheurs. Chaque lamproie sera aussitôt marquée avec deux marques de type "spaghetti" (ou T-bar tags) insérées à la base de la nageoire dorsale antérieure et postérieure à l'aide d'un trocart, puis relâché dans le milieu naturel. Le double marquage permettra d'estimer la probabilité de perte de marque, d'après le rapport du nombre de lamproies recapturées avec une seule marque. Les pêcheurs qui prélèveront des lamproies marquées appelleront le numéro de téléphone imprimé sur les marques (une campagne d'information sera préalablement menée auprès des pêcheurs), puis pourront garder leurs prises pour les commercialiser. Les marques porteront des numéros individuels permettant de connaître pour chaque individu la date du lâcher, ainsi que la date et le lieu de capture. Le taux de prélèvement sera calculé comme la proportion d'individus prélevés parmi les individus marqués, corrigée par le taux de perte de marques.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : L'espèce n'est pas substituable puisque les travaux portent spécifiquement sur la préservation de cette espèce.

Réduire : Au total, 3 000 individus seront marqués sur trois ans. Sur les 1 000 individus marqués lors d'une même année, 500 le seront sur une des deux rivières principales du système estuarien, et 500 sur l'autre. Les 500 individus marqués en une année sur un axe de migration le seront en 5 lots de 100 individus. Le marquage de chaque lot sera séparé d'environ deux semaines, pour couvrir la période de pêche de la lamproie marine, et le lieu de lâcher sera toujours le même sur chaque axe. Ceci permettra d'atteindre une puissance statistique suffisante pour modéliser l'éventuelle variation temporelle de la probabilité de capture au long de la saison.

Raffiner : Seules les lamproies vivantes et en bonne santé seront marquées, l'exondation ne durera que quelques secondes et sera mitigée par un linge humide posée sur la tête de la lamproie, qui a pour effet de calmer le poisson lors du marquage. La pose de deux marques implique une douleur équivalente à l'introduction de deux aiguilles. Une observation visuelle permettra de vérifier que la lamproie marquée nage normalement.

12793 La dépendance à la cocaïne, et aux drogues en général, est une pathologie chronique du cerveau qui se caractérise notamment par une recherche extrêmement motivée du produit, pouvant être réactivées même longtemps après un arrêt de la consommation. Le développement de ce comportement non adapté provient de modifications à long terme du fonctionnement de neurones situés dans plusieurs régions cérébrales constituant collectivement un système fortement impliqué dans les processus émotionnels et motivationnels. Au sein de ce circuit, les voies intracellulaires conduisant à l'activation d'un facteur de transcription traditionnellement mis en jeu dans la réponse

immunitaire, le NF-kB, semble impliqué dans les processus de récompense liés à la cocaïne et pourraient participer au développement d'un comportement motivé et donc celui caractérisant l'état de dépendance aux drogues, y compris la vulnérabilité à la rechute après sevrage. Dans ce cadre, nous proposons d'étudier l'effet de l'inhibition pharmacologique du NF-kB dans plusieurs modèles de rechute. Maîtrisant la technique d'auto-administration intraveineuse (AAiv) de cocaïne chez le rat, nous mesurerons l'impact d'interventions pharmacologiques sur le comportement de rechute à la cocaïne. Cette étude sera réalisée chez le rat mâle jeune adulte. Le nombre d'animaux par condition pharmacologique sera de 15 en tenant compte de pertes éventuelles liées à la chirurgie, à la non-conformité de certains animaux vis-à-vis des critères comportementaux, et en considérant la variabilité interindividuelle. Au total, nous estimons devoir utiliser, pour cette étude, un maximum de 381 animaux.

Concernant la règle des 3R,

Remplacer : Dans le domaine de la dépendance aux drogues, pathologie éminemment complexe nécessitant l'intégrité du cerveau en fonctionnement normal, il est impossible de s'affranchir de l'utilisation d'animaux vivants.

Réduire : Nous avons réduit au maximum le nombre de rats nécessaires aux analyses statistiques en tenant compte (notamment) de la variabilité interindividuelle dans le comportement (15 rats/condition pharmacologique).

Raffiner : Les animaux sont hébergés dans une animalerie agréée, en cycle inversé (nécessité d'habituation de 2-3 semaines avant des expériences comportementales), sous température et hygrométrie contrôlées et relevées quotidiennement. Initialement par groupes de 4, ils sont placés en cage individuelle pendant la période péri-opératoire (2 jours avant, 5 jours après) puis sont remis en binômes (chacun constitué de rats auparavant dans la même cage de 4). Il est important de noter que la chirurgie nécessaire à ce type d'expériences, réalisée sous anesthésie générale et sous analgésie locale et générale, est de courte durée (35 min) et n'induit pas, sauf cas exceptionnel, de souffrance détectable chez le rat. Un suivi sanitaire méticuleux, veillant au bien-être de l'animal, est néanmoins assuré, grâce une grille de notation précise permettant l'évaluation de la souffrance du sujet. Si un point critique de la santé de l'animal est atteint, la procédure est interrompue. Ainsi, la souffrance de l'animal est limitée.

12794 La capacité des cellules cancéreuses à migrer et à envahir l'organisme par dissémination métastatique est une des caractéristiques majeures de la progression tumorale. Afin de pouvoir lutter contre le cancer il est donc essentiel de comprendre les mécanismes cellulaires qui régissent la migration des cellules. Parmi les facteurs les plus importants qui contrôlent le comportement migratoire figurent les composants moléculaires d'une voie de signalisation appelée voie de la « Polarité Cellulaire Planaire » (PCP). Au cours de l'embryogénèse l'activité de la voie PCP est, par exemple, responsable de l'élongation antéro-postérieure de l'embryon. La signalisation PCP est également requise pour la migration des cellules tumorales, et des dérégulations de la voie PCP sont associées à de nombreux cancers. Notre équipe utilise le poisson zèbre, un modèle reconnu pour l'étude de pathologies humaines, pour étudier la régulation de la signalisation PCP. Dans ce contexte, nous avons été amenés à nous intéresser à la molécule « Receptor-like Tyrosine Kinase » (RYK) dans la signalisation PCP. L'objectif du présent projet d'expérimentation animale est de générer des lignées de poisson zèbre porteuses de mutations du gène ryk.

Notre équipe utilise l'embryon de poisson zèbre comme modèle biologique pour étudier la signalisation PCP dans le contexte des mouvements cellulaires qui permettent de former le « tube neural », une partie de l'embryon qui donnera naissance à la moelle épinière. Afin de minimiser le recours à l'expérimentation animale nous avons mis en place une approche de remplacement et effectuons l'ensemble de nos études fonctionnelles à des stades de développement embryonnaires ne relevant pas de l'expérimentation animale (i.e. avant 5 jours de développement). Des expériences effectuées chez l'embryon entre 0 et 48h par utilisation de Morpholinos (un réactif chimique injectable permettant d'empêcher la production de la protéine ryk) indiquent que ryk est requis pour l'élongation du tube neural. Alors que l'utilisation de Morpholinos peut apporter des premières informations, plusieurs études ont démontré qu'il est essentiel de reproduire les résultats

obtenus par l'utilisation d'un mutant génétique. Le phénotype résultant de l'inactivation génique de ryk chez le poisson zèbre est inconnu à ce jour. L'objectif du présent projet d'expérimentation animale est donc d'utiliser le système Crispr/Cas9, un système de ciseaux moléculaires permettant d'introduire des mutations au sein d'un gène d'intérêt, pour générer des lignées de poisson porteuses de mutations invalidant totalement le gène ryk.

Dans ce qui suit, nous décrivons les deux procédures expérimentales qui seront mises en œuvre dans le cadre de cette étude: 1, La création de lignées porteuses de mutations du gène ryk. 2, Si des mutants du gène ryk sont viables, nous réaliserons par ailleurs l'élevage et le maintien d'animaux homozygotes mutants qui serviront comme géniteurs pour produire des embryons totalement dépourvus de la fonction de ryk.

Les animaux générés au cours du présent projet d'expérimentation animale serviront uniquement comme adultes reproducteurs. L'effet des mutations générées sur les mouvements cellulaires embryonnaires sera étudié au cours d'expériences qui – de par le stade du développement auxquelles elles seront effectuées (avant 5 jours de développement) ne relèveront pas du domaine de l'expérimentation animale. La réalisation de ces expériences nous permettra d'améliorer notre connaissance des mécanismes fondamentaux régissant les mouvements cellulaires au cours du développement embryonnaire ainsi que de la dissémination métastatique.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Le projet vise à comprendre les mécanismes régissant la morphogenèse d'un organisme vertébré, il n'existe pas de modèle cellulaire permettant de reproduire ce processus dans sa complexité.

Réduire Nous prévoyons ici un nombre maximum de 2350 animaux en nous basant sur des estimations chiffrées motivées dans la demande. Dans un souci de respect de la règle des 3R, ce nombre maximal d'animaux pourra ensuite être réduit en fonction des résultats obtenus à différentes étapes du projet.

Raffiner : Nous effectuerons un suivi régulier des animaux générés afin d'assurer leur maintien dans des conditions optimales pour leur bien-être.

12795 La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est la leucémie aiguë de l'adulte la plus commune. En Europe et aux Etats-Unis, l'incidence et le taux de mortalité de la LAM sont d'environ 4/100.000 et 3/100.000 par an, respectivement. En dépit d'un taux élevé de rémissions complètes après traitement avec les agents génotoxiques, le taux de rechute demeure très important. La chimiothérapie de première ligne est souvent efficace pour éliminer les cellules leucémiques, mais des rechutes éloignées sont observées chez la majorité des patients, caractérisées par l'amplification de clones leucémiques chimio-résistants qui trouvent leur origine dans les cellules initiatrices de leucémie (CIL), également appelées Cellules Souches Leucémiques (CSL). Des travaux très récents réalisés chez l'homme sur des cohortes américaines de tissu sain stocké au fil du temps ont permis de montrer qu'il est possible de prédire la survenue d'une LAM à plusieurs années de distance en fonction des mutations que l'on peut identifier dans des cellules saines ayant un potentiel initiateur de leucémie. Néanmoins, il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode in vitro satisfaisante pour isoler chez l'homme une cellule normale ayant un potentiel de CIL qui permettrait de prédire le risque de développer une leucémie sur une simple prise de sang. Ce projet vise à identifier et à valider des biomarqueurs fonctionnels exprimés dans des cellules souches initiatrices de leucémie et pouvant constituer de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. L'étude de l'initiation de la leucémie nécessite le recours à des modèles animaux de LAM présentant un phénotype dommageable.

Parmi les modèles de LAM, ceux inductibles par la doxycycline chez la souris permettent de limiter au maximum le phénotype dommageable lié au développement leucémique. Dans ces modèles, il est possible de contrôler l'initiation de la leucémogenèse et ce de façon réversible. Nous utiliserons un tel modèle récemment publié que nous croiserons sur des modèles de knock-out conditionnels pour nos biomarqueurs et cibles thérapeutiques d'intérêt.

Nous utiliserons la méthode des 3 R

Remplacer : pour réduire à son minimum le nombre d'animaux et, chaque fois que cela sera possible, le modèle in vivo sera remplacé par des modèles de culture in vitro.

Réduire : Quatre lignées de souris génétiquement modifiées pour nos biomarqueurs et cibles thérapeutiques d'intérêt seront croisées sur le modèle de LAM inductible pour l'analyse de l'initiation de la leucémie. 18 animaux femelles sont nécessaires pour chaque condition expérimentale qui sont au nombre de six, ce qui représente 108 femelles et un nombre total de 216 animaux au phénotype dommageable.

Raffiner : Dans un souci de raffinement et de réduction, le suivi du développement leucémique se fera par des mesures cinétiques utilisant des procédés peu invasifs (prélèvement sanguin sous anesthésie) suivis de tests phénotypiques et fonctionnels in vitro ou greffe de moelle osseuse dans des souris récipientes irradiées si aucune alternative n'est possible. Afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux au cours des procédures nécessaires à la réalisation de nos objectifs, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés, coton et Cellodome) et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement.

12796 Le glioblastome est une tumeur cérébrale actuellement incurable malgré un traitement combinant chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie, ce qui nécessite de trouver rapidement des nouvelles solutions thérapeutiques. Un facteur limitant l'efficacité des traitements existants pour le glioblastome est la présence des cellules tumorales qui ne répondent pas aux agents de chimiothérapie. Nous avons démontré au laboratoire l'innocuité et la stabilité d'une nouvelle famille de peptides capables de cibler sélectivement le récepteur au LDL, surexprimé par les cellules tumorales. Ces peptides peuvent être conjugués à l'agent anticancéreux Paclitaxel afin de cibler son activité cytotoxique sur les cellules tumorales et ainsi augmenter son efficacité thérapeutique tout en réduisant ses effets secondaires.

Dans ce projet, nous souhaiterions évaluer l'efficacité des conjugués peptide-paclitaxel chez l'animal (souris nude athymique) porteur de glioblastome. Les conjugués seront directement administrés dans la tumeur, dans la cavité de résection chirurgicale ou par administration intraveineuse afin d'évaluer la voie d'administration optimale pour améliorer la survie.

Respect de la règle des 3R /

Remplacer : Cette étape de validation in vivo de l'efficacité des conjugués peptide-paclitaxel est indispensable avant toute évaluation clinique chez le patient. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale dans ce domaine.

Réduire ; Au total, un maximum de 150 souris est prévu pour la totalité de l'étude. Le nombre d'animaux prévu est minimum et suffisant dans chaque groupe. Il est basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 80% de chance de mettre en évidence un effet du traitement s'il existe réellement.

Raffiner : Les modèles expérimentaux et les techniques chirurgicales utilisées dans ce projet sont parfaitement maîtrisés par les expérimentateurs, qui seront capables de réduire au minimum la souffrance et le stress des animaux afin de garantir leur bien-être et la fiabilité des données collectées au cours de l'étude. Les souris seront hébergées selon les normes requises avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) et en groupes de 5 individus par cage (365x205x140 cm, 530 cm²) afin d'éviter le stress de l'isolement. Outre l'anesthésie générale durant toutes les procédures expérimentales (injection des cellules tumorales, résection chirurgicale, administration des traitements), de l'analgésie en pré- et post-opératoire est aussi prévue. Nous vérifierons l'état de santé des souris quotidiennement : tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation, ataxie) sera relevé et évalué grâce à une grille d'évaluation de la douleur. Lorsque les souris présenteront une perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids maximum ou si des signes cliniques apparaissent, les animaux seront mis à mort sans délai.

12797 Afin qu'un nouveau composé devienne un médicament sûr et efficace, un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire. Il s'agit ici d'un renouvellement d'autorisation. La règle des 3R (réduire, remplacer et raffiner) est ainsi mise en œuvre dans toutes les études.

L'objectif de ce projet est la réalisation des études de Pharmacologie chez le furet pour un produit donné en vue d'une administration unique ou répétée. Le choix du furet se justifie par la nécessité d'une forte analogie entre l'animal et l'Homme ce qui est le cas en ce qui concerne le fonctionnement du système vomitif. Il faut également prendre en compte les données scientifiques disponibles. Ces études sont réalisées dans un objectif de progrès scientifique ou biomédical avec des conséquences positives sur l'Homme ou l'animal pour les produits vétérinaires. Elles permettent un gain potentiel en terme de brevet ou d'acquisition de compétences et connaissances diverses. Elles sont dommageables en ce qui concerne les souffrances plus ou moins importantes de l'animal ainsi que sur le nombre d'animaux utilisés, c'est pourquoi l'intervention des Vétérinaires, du Directeur d'études et de la Structure de Bien-Être Animal (SBEA) est indispensable afin de réduire les dommages en respectant la règle des 3R.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : La réglementation impose des tests précliniques sur l'animal avant le passage à l'Homme pour les essais cliniques.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés est adapté à la nécessité d'évaluation des résultats sur un effectif suffisant et correspond à ce qui doit être mis en œuvre pour des études réglementaires de ce type. Ce nombre est estimé à 112 animaux. Le nombre important d'animaux utilisés s'explique par la quantité d'études différentes réalisées pour des produits différents. Les dommages sont inhérents aux études précliniques, qui consistent à administrer des substances pouvant provoquer un effet pharmacologique ou toxique, et à surveiller pendant une période définie l'apparition d'anomalies cliniques ou physiologiques, puis à mettre à mort les animaux si des études post mortem sont nécessaires.

Raffiner : Le raffinement sera appliqué à toutes les phases des procédures en conformité avec les recommandations internationales publiées concernant le bien-être animal : nous veillerons aux techniques d'administration pour réduire l'inconfort des animaux, nous appliquerons des points limites précoces pour réduire la souffrance en cas de produits présentant une toxicité, nous procurerons un environnement enrichi et une socialisation des animaux en groupes. Les techniques pouvant engendrer du stress, comme un isolement temporaire, seront limitées au minimum, et la douleur sera traitée avec une anesthésie et une analgésie appropriée, sous supervision vétérinaire constante. Une démarche qualité rigoureuse, une supervision de chaque lot d'étude par le directeur d'étude concerné, ainsi que des bilans réguliers impliquant les techniciens, permettront d'appliquer toute alternative respectueuse du bien-être animal. Ils sont hébergés selon les standards en vigueur pour la durée du projet et disposent d'un programme d'enrichissement. Les furets sont des animaux socialisés en permanence hormis lors des observations ou des enregistrements. Ils font l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. En cas de signes cliniques ayant des répercussions sur le bien-être animal, des mesures rapides et appropriées seront prises par le vétérinaire et/ou le directeur d'étude pour maximiser le bien-être des animaux.

12798 Afin qu'un nouveau composé devienne un médicament sûr et efficace, un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire. Il s'agit ici d'un renouvellement d'autorisation. La règle des 3R (réduire, remplacer et raffiner) est ainsi mise en œuvre dans toutes les études.

L'objectif de ce projet est la réalisation des études de toxicologie et pharmacologie chez le mini-porc pour un produit donné en vue d'une administration unique ou répétée. Le choix du mini-porc se justifie par la nécessité d'une forte analogie entre l'animal et l'Homme et en prenant en compte les données scientifiques disponibles. Ces études sont réalisées dans un objectif de progrès scientifique ou biomédical avec des conséquences positives sur l'Homme ou l'animal pour les produits vétérinaires. Elles permettent un gain potentiel en terme de brevet ou d'acquisition de compétences et connaissances diverses. Elles sont dommageables en ce qui concerne les souffrances plus ou moins importantes de l'animal ainsi que sur le nombre d'animaux utilisés, c'est

pourquoi l'intervention des Vétérinaires, du Directeur d'études et de la Structure de Bien-Être Animal (SBEA) est indispensable afin de réduire les dommages en respectant la règle des 3R.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : La réglementation impose des tests précliniques sur l'animal avant le passage à l'Homme pour les essais cliniques.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés est adapté à la nécessité d'évaluation des résultats sur un effectif suffisant et correspond à ce qui doit être mis en œuvre pour des études réglementaires de ce type. Ce nombre est estimé à 1800 animaux. Le nombre important d'animaux utilisés s'explique par la grande quantité d'études différentes réalisées pour des produits différents.

Raffiner : Le mini-porc dispose d'un programme d'enrichissement avec un aménagement de son environnement ainsi que des récompenses. Les études précliniques consistent en l'administration de substances pouvant provoquer un effet pharmacologique ou toxique, et à surveiller pendant une période définie l'apparition d'anomalies cliniques ou physiologiques, puis à mettre à mort les animaux si des études post mortem sont nécessaires.

Le raffinement sera appliqué à toutes les phases des procédures en conformité avec les recommandations internationales publiées concernant le bien-être animal : nous veillerons aux techniques d'administration pour réduire l'inconfort des animaux, nous appliquerons des points limites précoces pour réduire la souffrance en cas de produits présentant une toxicité, nous procurerons un environnement enrichi et une socialisation des animaux en groupes en ce qui concerne les femelles. Les techniques pouvant engendrer du stress, comme un isolement temporaire, seront limitées au minimum, et la douleur sera traitée avec une anesthésie et une analgésie appropriée, sous supervision vétérinaire constante. Une démarche qualité rigoureuse, une supervision de chaque lot d'étude par le directeur d'étude concerné, ainsi que des bilans réguliers impliquant les techniciens, permettront d'appliquer toute alternative respectueuse du bien-être animal. Les mini-porcs sont hébergés selon les standards en vigueur pour la durée du projet. Les animaux font l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. En cas de signes cliniques ayant des répercussions sur le bien-être animal, des mesures rapides et appropriées seront prises par le vétérinaire et/ou le directeur d'étude pour maximiser le bien-être des animaux.

12799 L'insuffisance cardiaque « IC » est un syndrome qui se caractérise par l'incapacité du cœur à fournir un débit sanguin nécessaire au bon fonctionnement des organes. Il s'agit d'une maladie grave qui nécessite une prise en charge rapide. Les patients insuffisants cardiaques souffrent d'une atteinte de la fonction cardiaque (que ce soit la fonction systolique et/ou diastolique du cœur) et développent plusieurs signes et symptômes caractéristiques de la pathologie (tels que l'essoufflement, l'œdème pulmonaire et périphérique...).

A l'heure actuelle deux formes majeures d'insuffisance cardiaque sont reconnues par la Société Européenne de Cardiologie et l'Association Américaine de Cardiologie et classées selon le niveau d'altération de la fraction d'éjection (paramètre mesuré par échographie et qui permet de quantifier le pourcentage de sang éjecté à chaque contraction cardiaque).

L'IC chronique à fraction d'éjection réduite (HF_rEF) : caractérisée par une altération de la capacité du cœur à se contracter. Ce type d'IC survient, dans la plupart des cas, suite à un infarctus du myocarde. 50% des patients insuffisants cardiaques, souffrent d'une HF_rEF. A l'heure actuelle, ce type d'IC est bien pris en charge et plusieurs médicaments ont déjà prouvé leur efficacité chez les patients autour du monde.

L'IC chronique à fraction d'éjection préservée (HF_pEF) : caractérisée par une altération du remplissage et de relaxation (altération de la fonction diastolique : période durant laquelle le cœur se remplit) en présence d'une fonction contractile normale du muscle cardiaque. Parmi les patients souffrant d'IC, la proportion de ceux atteints d'une HF_pEF dans le monde ne cesse d'augmenter (environ 50% des patients insuffisants cardiaques). De plus, les patients atteints de cette pathologie présentent, dans la majorité des cas, des facteurs de risques (hypertension, diabète, obésité...) qui rendent la compréhension de la physiopathologie de cette forme d'insuffisance cardiaque plus

complexe. A l'heure actuelle, aucun traitement n'a montré une efficacité chez le patient HFpEF. Environ 70% des patients insuffisants cardiaques à fraction d'éjection préservée présente une hypertension artérielle. Les patients souffrant de ce type de pathologies constituent une population très hétérogène, où les facteurs de risques (diabète, hypertension) jouent un rôle très important dans la progression et l'aggravation de la pathologie.

L'absence ou la mauvaise prise en charge médicale des patients insuffisants cardiaques (HFpEF ou HFrEF) peut mener à une insuffisance cardiaque aiguë décompensée, une situation d'aggravation importante de la fonction cardiaque. Cet état de détresse et d'urgence conduit à l'hospitalisation du patient. A l'heure actuelle, beaucoup de projets de recherches sont en cours car peu de traitements ont démontré une efficacité pour limiter ces hospitalisations.

Le but de ce projet, consiste d'une part à mettre en place un modèle d'IC à fraction d'éjection préservée, le modèle de rat SHR/L-NAME (procédure 1) mais également un modèle d'IC décompensée (procédure 2) afin d'étudier les modifications moléculaires, cellulaires et fonctionnelles à l'origine de ces pathologies et tester l'efficacité de candidats médicaments.

L'Insuffisance cardiaque est un syndrome qui peut être étudié au laboratoire grâce à des modèles précliniques in vivo et ainsi permettre la découverte de nouvelles thérapies. Actuellement, plusieurs modèles récapitulant la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite (le modèle d'ischémie cardiaque permanente, le modèle d'ischémie reperfusion) sont mis en place, caractérisés et validés au sein de notre département. Néanmoins concernant l'IC à fraction d'éjection préservée, très peu de modèles ont été étudiés et pour le moment aucun de ces modèles ne récapitule la pathologie humaine.

Ce projet vise à développer un modèle expérimental consistant à traiter des rats spontanément hypertendus par une molécule chimique le L-NAME pendant 15 jours. Le L-NAME va induire une importante dysfonction endothéliale en induisant une rigidité des vaisseaux (hypertension), une augmentation de la masse du muscle cardiaque et une fibrose. L'ensemble de ces modifications va mener à une altération de la fonction du cœur. Ces résultats nous laissent présager que ce modèle, qui était historiquement utilisé dans notre département dans le cadre d'une recherche sur l'hypertension artérielle, pourra constituer un bon modèle d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

Notre but dans un premier temps va consister à caractériser le modèle (échocardiographie afin d'étudier la fonction cardiaque dans sa globalité, quantification de biomarqueurs circulants et tissulaires pour mieux comprendre la physiopathologie du modèle, évaluation de l'hémodynamie cardiaque pour étudier des propriétés spécifiques au muscle cardiaque qu'on ne pourra pas explorer par échocardiographie, et ceci sous deux modalités de mise en œuvre :

-Modèle court d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (15-16 jours maximum entre l'induction du modèle par administration de LNAME et les évaluations terminales).

-Modèle long d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (6.5 mois maximum entre le début du traitement par le LNAME et les évaluations terminales).

Le but de ces 2 types d'études étant de valider l'intérêt et l'efficacité de candidats médicaments à respectivement reverser la pathologie (après la déclaration de la pathologie), ou prévenir son apparition ou ralentir la progression de la pathologie.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Le recours à l'animal est obligatoire pour connaître l'activité pharmacologique dans un organisme entier et vivant, impliquant l'ensemble des mécanismes physiopathologiques.

Réduire : Le nombre d'animaux prévu par groupe est déterminé en collaboration avec notre département de bio-statistiques. Dans ce projet nous estimons nécessaire l'utilisation de 1950 rats : 1085 pour la procédure 1 et 865 pour la procédure 2 pour une durée de 5 ans.

Raffiner : Durant l'ensemble de nos études, l'état général des rats sera suivi quotidiennement afin de détecter et d'anticiper tout signe de souffrance. Les rats seront essentiellement maintenus par deux en cages enrichies d'éléments visant à leur permettre d'exprimer leurs instincts (comme des morceaux de bois à ronger).

En cas de manifestation des points limites, l'animal sera pris en charge pour des soins vétérinaires. Des critères d'arrêt seront appliqués.

12800 Depuis 2014, notre centre de formation agréé est le lieu de dispense de la formation UPAL (Utilisation et protection des animaux de laboratoire) en faisant appel à des prestataires externes. Nous souhaitons dispenser notre propre formation et pour se faire, nous avons déposé une demande d'approbation à la Direction Départementale (de la cohésion sociale) et de la Protection des Populations (DD(CS)PP) à la date du 1er août 2018 pour les fonctions Concepteur et Appicateur. Nous avons reçu un avis favorable en Novembre 2018 pour 5 ans. Nous allons donc dispenser ces formations pendant 5 ans à raison d'une session par an maximum

Effectifs des participants pour chaque session (1 session comporte les deux fonctions Concepteur et Appicateur):

-Fonction concepteur : 12 participants maximum.

-Fonction applicateur : 8 participants maximum.

Dans le programme de cette formation nous avons l'obligation d'intégrer dans le programme des travaux pratiques sur des animaux de laboratoires. Nous réaliserons ces TP sur deux espèces rongeurs à savoir rat et souris.

Nous utiliserons 20 animaux /session, 10 rats Wistar femelles de 8 semaines et 10 souris Balb/c femelles de 8 semaines afin d'utiliser un animal de chaque espèce pour 2 stagiaires et de ce fait réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Cela représente un total de 100 animaux maximum pour les 5 sessions (20 animaux par session). Les travaux pratiques seront dispensés par 3 encadrants, un vétérinaire responsable d'animalerie de laboratoire, un assistant ingénieur en expérimentation animale et un zootechnicien et se dérouleront de la manière suivante:

(1) Manipulation, contention, techniques peu invasives, démonstration de l'approche et de la manipulation d'une souris, et des contentions spécifiques pour réaliser un gavage et des injections sous-cutanée, intramusculaire, intra-péritonéale sous le contrôle des encadrants.

(2) Anesthésie, prélèvements et euthanasie:

Ces techniques seront apprises selon les règles de l'éthique et du bien-être animal. Les rats seront anesthésiés avec un anesthésique gazeux pour les démonstrations et réalisations de prélèvement sanguin à la queue, et de prélèvement au niveau de la veine caudale

Les souris seront anesthésiées avec un anesthésique chimique pour les démonstrations et réalisations de prélèvements sanguins à la veine maxillaire.

Pour finir les stagiaires devront euthanasier les animaux anesthésiés sous le contrôle des encadrants.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : La nature même du projet requiert l'utilisation d'animaux vivants, même si la formation peut s'appuyer aussi sur d'autres supports pédagogiques.

Réduire : Afin que les stagiaires puissent avoir une maîtrise des gestes à réaliser nous effectuerons en premier lieu un TP sur des cadavres d'animaux congelés issus de projet antérieur pour la contention et les contentions spécifiques pour réaliser un gavage et des injections sous-cutanée, intramusculaire, intra-péritonéale.

Raffiner: Les animaux utilisés seront hébergés au sein d'une animalerie agréée sous des conditions d'hygrométrie et de température optimales, hébergés en groupe sociaux. Les cages seront équipées de matériel d'enrichissement tel que des igloos et des briques de peupliers.

Durant les manipulations les animaux seront anesthésiés et analgésiés pour les procédures de prélèvement sanguin.

12801 Le but de ce projet est de développer un traitement pour une collagénopathie. Il s'agit d'une dysplasie osseuse génétique qui cause une forme rare de nanisme chez l'être humain. Elle est caractérisée par une petite taille avec un raccourcissement du tronc et du cou, induisant un risque

important d'instabilité aux niveaux des vertèbres cervicales pouvant induire une paralysie. Les patients souffrent également d'anomalies au niveau des yeux et une perte d'audition. Cette pathologie est due à des mutations perte de fonction dans un gène du collagène.

Ce projet est réalisé en deux étapes.

D'abord une étape qui va utiliser des souris de laboratoire dites sauvages et des mini porcs. Cette étape a pour but de réaliser une sélection de vecteurs potentiels pour amener le médicament au lieu où celui-ci doit agir (la plaque de croissance). La souris est utilisée dans un premier temps car elle permet une sélection rapide et le mini porc dans un deuxième temps car sa plaque de croissance est très proche de celle de l'homme.

In fine, nous utiliserons également un modèle de souris mimant la pathologie pour tester l'efficacité de notre traitement en cours de développement. Il s'agit d'un mutant spontané dont les symptômes sont similaires à la pathologie humaine avec des atteintes du squelette, des anomalies de la rétine et un développement anormal de l'oreille interne.

Ce projet aura des bénéfices pour l'homme sur plusieurs niveaux. D'une part, à l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour ces maladies permettant de restaurer une croissance osseuse et donc de permettre aux patients de grandir mais surtout d'éliminer les complications dues à cette pathologie. D'autre part, cette pathologie étant encore peu connue, ce projet nous permettra de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie grâce au modèle de souris malades.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Nous avons réalisé un screening in vitro des approches thérapeutiques à tester afin de ne tester in vivo que les stratégies présentant un potentiel thérapeutique élevé. L'utilisation de la souris dans la première partie du projet avant le mini porc, nous permet de réduire le nombre de molécules à tester chez le mini porc et donc de réduire au final le nombre d'animaux nécessaires au projet.

Réduire : Nous allons utiliser des groupes contrôles en commun quand cela est possible. Nous estimons que nous allons utiliser au maximum 7295 souris soit 95 souris dans la procédure 1, 7200 souris dans la procédure 3 et 550 mini porc dans la procédure 2 sur une période de 5 ans.

Raffiner : Nous avons établi des points limites et des traitements (antiseptique...) adaptés aux animaux que nous utilisons et aux expérimentations que nous pratiquons. Toujours dans un souci de raffinement, les mini porcs sont anesthésiés avec maintien d'une température constante sur tapis chauffant lors des injections afin de réduire l'inconfort des animaux. Tout ceci permet de préserver le bien-être de l'animal, en cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée.

12802 La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin, affectant principalement l'iléon terminal, le colon et l'anus. Elle se caractérise par un dysfonctionnement du système immunitaire sous l'influence de facteurs environnementaux chez des individus génétiquement prédisposés. La prévalence de la MC ne cesse d'augmenter, touchant actuellement 150 000 sujets en France. Il n'existe aujourd'hui que des traitements symptomatiques visant à prévenir les complications et/ou bloquer la progression de la maladie. L'activité physique ainsi que l'apport d'acides gras polyinsaturés n-3 via la graine de lin, dont les effets anti-inflammatoires ne sont plus à démontrer pourrait être utilisés comme traitement préventif primaire.

La composition microbienne intestinale constitue un écosystème complexe qui est aujourd'hui reconnu comme étant impliqué dans la santé de l'Homme. La MC résulterait d'une réponse immunitaire aberrante en réponse à une stimulation par le microbiote intestinal. Une rupture de l'homéostasie peut entraîner une réaction inflammatoire excessive et non contrôlée aboutissant à l'apparition de la MC. Une dysbiose du microbiote intestinal est aussi retrouvée chez ces personnes.

Le modèle transgénique de souris utilisé dans cette étude mime la pathologie de la maladie de Crohn chez l'humain. Il en résulte le développement d'une inflammation intestinale similaire à celle observée chez des patients atteints de la MC.

Pour cette étude, 60 souris, souffrant d'inflammation intestinale chronique, âgés de 8 semaines seront réparties en différents groupes. Les animaux seront nourris avec un régime riche en lipides complétement ou non en acides gras polyinsaturés n-3. Cette complémentation sera directement intégrée dans l'alimentation, pendant 12 semaines. Les souris seront placées dans des cages individuelles avec des roues afin de suivre et mesurer l'activité physique spontanée. Suite au 12 semaines les souris seront traitées au DSS et infectées par une souche bactérienne pro-inflammatoire. L'objectif principal est de déterminer si l'activité physique spontanée et la complémentation en acides gras polyinsaturés n-3 ont un effet préventif primaire sur le statut inflammatoire, systémique et intestinal, lors d'inflammation aigue intestinale similaire à celle observée chez des patients de la MC. Dans un second temps, la variation du microbiote intestinal sera étudiée afin de déterminer le régime le plus efficace permettant de modifier favorablement le microbiote intestinal des souris. L'évolution du profil lipidique sera également évaluée.

La question se pose de savoir si un apport en acides gras polyinsaturés n-3, chez l'animal, associé à une d'activité physique spontanée (système ROUE), potentialiserait les effets attendus sur la composition corporelle, l'inflammation et le microbiote intestinal dans un contexte de MC.

Dans sa globalité, le projet de recherche proposé permettra d'identifier les moyens de faire évoluer les comportements vers des pratiques saines et durables et mettra à disposition des éléments pour orienter les politiques publiques et privées dans le but d'améliorer à la fois la santé et le bien-être des populations. Il permettra d'apporter de nouveaux éléments visant à terme à déterminer l'impact de l'environnement et des pratiques sociétales sur le microbiote intestinal et sur la santé humaine et à proposer des alternatives inédites aux traitements biologiques.

Respect de la règle des 3R

Remplacer, Afin de comprendre les mécanismes adaptatifs au complément et/ou l'activité physique spontanée, nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation in vitro, ex vivo ou in-silico.

Réduire : Le nombre d'animaux par lot est toutefois limité au maximum (à partir d'un test de puissance en lien avec la littérature).

Raffiner : Les souris (n=60) seront mises en cage individuelle dans un environnement enrichi dès leur arrivée (roue ou balle en inox suivant le groupe). Bien que l'isolement induise un stress sur l'animal, il est nécessaire pour cette étude pour le suivi hebdomadaire de la prise alimentaire et surtout le suivi de l'activité physique spontanée. Toutefois, les cages seront transparentes et collées les unes aux autres ainsi elles permettront aux animaux de se voir et se sentir.

Aucune procédure très douloureuse n'est prévue mais si besoin nous mettrons en œuvre des méthodes permettant de limiter au maximum toute éventuelle souffrance de nos animaux (mise en place de points limites, utilisation de cages adaptées et surveillance quotidienne des animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins ou d'exclusion d'animaux en souffrance).

12803 Les maladies chroniques du foie sont fréquentes. Par exemple, on estime qu'il y a en France environ 700'000 malades atteints de cirrhose. La stéatohépatite non alcoolique (ou NASH) est l'une des principales causes de l'apparition des maladies chroniques du foie comme la cirrhose ou le cancer du foie, et est souvent associée au syndrome métabolique. Elle est définie par l'accumulation excessive de lipides dans le foie (stéatose), d'une mort excessive des cellules du foie (les hépatocytes), d'une inflammation hépatique avec ou sans fibrose (apparition de tissu cicatriciel dans le foie, prélude de la cirrhose). Aucun agent thérapeutique efficace n'est actuellement disponible pour la NASH. Plus généralement, les mécanismes responsables de la progression des maladies du foie vers la cirrhose et ses complications comme le cancer du foie, restent incomplètement compris. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait d'identifier de potentiels traitements.

Les cellules qui bordent la face interne des vaisseaux sanguins du foie sont des cellules endothéliales et forment dans leur ensemble l'endothélium hépatique. Bien que leur rôle soit mal élucidé, elles semblent importantes dans des processus-clé que sont la progression de la fibrose et du cancer du foie.

Résultats préliminaires :

Il a déjà été démontré sur des biopsies hépatiques humaines que dans ces cellules endothéliales du foie, le processus d'autophagie est ralenti. L'autophagie est un processus cellulaire par lequel des composants cellulaires dysfonctionnels sont dégradés et recyclés, qui est donc très important pour le bon fonctionnement de toutes les cellules du corps.

Objectifs du projet : comprendre le rôle de l'endothélium hépatique dans les maladies chroniques du foie telles que la NASH et la cirrhose, et particulièrement le rôle de l'autophagie endothéliale. A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre la physiopathologie des maladies du foie et d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de ces maladies qui souffrent du manque d'agents thérapeutiques efficaces.

Protocole expérimental :

Des lignées de souris présentant une déficience en autophagie endothéliale seront créées ; une greffe de moelle osseuse sera réalisée après irradiation pour obtenir un modèle plus pertinent et donc des résultats plus fiables. Les souris seront alimentées avec des régimes alimentaires spécifiques (régime gras ou régime déficient en certains nutriments) afin de provoquer une NASH ce qui nous permettra d'évaluer le rôle de l'endothélium dans le développement de cette maladie. D'autres souris seront injectées de façon intrapéritonéale avec du tétrachlorure de carbone, qui provoque l'apparition d'une fibrose hépatique, afin d'évaluer le rôle des cellules endothéliales dans son développement. Dans un troisième temps, le potentiel thérapeutique de l'activation de l'autophagie endothéliale sera évalué en stimulant ce processus chez des souris atteintes de maladie du foie avec le traitement qui sera injecté par voie intraveineuse, approche qui pourrait ensuite être transposée à l'être humain si elle se révèle efficace. L'ensemble des procédures durera entre 6 semaines et 26 semaines au total selon le groupe auquel appartient l'animal. A la fin des procédures, les souris seront euthanasiées.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Il n'existe pas de modèle in vitro reproduisant de manière fiable la NASH ou la cirrhose. L'utilisation de modèles animaux est donc essentielle. C'est vers des modèles de souris que se porte notre choix car des souris transgéniques existent permettant de supprimer spécifiquement dans l'endothélium des processus cellulaires et en particulier l'autophagie.

Réduire : Des expériences in vitro sur cellules en cultures seront effectuées avant toute expérience animale dans le but de seulement valider chez l'animal ce qui aura été identifié in vitro. Ceci permettra donc de réduire le nombre d'animaux qui sera utilisé. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet a été calculé de manière à minimiser le nombre de souris tout en assurant des résultats robustes scientifiquement et statistiquement. Les souris témoin qui constitueront les groupes contrôles seront utilisées dans différents protocoles. Ce projet se déroulera sur cinq ans et nécessitera 990 souris.

Raffiner : Tous les animaux qui seront utilisés dans ce projet seront surveillés quotidiennement et toutes les mesures nécessaires à leur bien-être seront prises (présence de maisons en plastique dans les cages, bâtonnets en bois et cotons). De même, toutes les mesures en vue de réduire la souffrance, le stress ou l'angoisse seront prises si un animal présente un de ces signes : des antalgiques seront administrés si une douleur est détectée et les interventions douloureuses se feront sous anesthésie. Pour chacune des procédures, des mesures à suivre en cas de détection de douleur ou de détresse ont été définies de façon détaillée (exemples : administration d'antalgiques, sortie de procédure, arrêt des expériences). Des points limites adaptés à chaque procédure ont également été définis. Si l'un des animaux atteint l'un des points limites ultimes, il sera humainement euthanasié.

12804 Au cours de la recherche d'un candidat médicament, outre les études effectuées in vitro (identification des cibles moléculaires, effets en culture cellulaire ou sur des organes isolés...), un ensemble d'études in vivo, utilisant des animaux, est nécessaire pour s'assurer de l'efficacité (dose active sur un organe ou un tissu) et la sécurité d'emploi (dose maximale tolérée...). L'objectif de ce projet est la réalisation des études de toxicologie et de pharmacologie, en vue d'une administration

unique ou répétée d'un candidat médicament, chez le lapin qui est une des espèces non rongeurs, très utilisée pour les études de toxicologie, puisqu'elle présente une grande sensibilité aux malformations, il s'agit également de l'espèce recommandée pour l'évaluation de la toxicité des vaccins. Les animaux seront soumis à des études qui respectent les recommandations internationales en vigueur (durée, paramètres étudiés...) : une ou plusieurs doses de la molécule seront administrées, puis des prélèvements sanguins ou des examens physiologiques pourront être effectués à des intervalles réguliers. Par obligation, la plupart des animaux seront mis à mort à la fin de l'étude pour procéder à des analyses histologiques post mortem. Si ce n'est pas le cas, les animaux pourront être inclus dans une autre étude après vérification par un vétérinaire de leur bon état de santé.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : La réglementation internationale et française impose ces études pour constituer le dossier examiné par les autorités de santé, et elles doivent être obligatoirement conduites au moins dans deux espèces animales, dont une « non rongeur », avant toute étude clinique chez l'homme, le recours à l'animal est donc indispensable.

Réduire : Du fait qu'un grand nombre d'études sont nécessaires, pour un grand nombre de produits, plusieurs voies d'administration et plusieurs doses, le nombre total d'animaux est estimé pendant les 5 ans du projet à 12240. Pour chaque étude néanmoins l'exigence de réduction sera respectée, en réduisant au minimum le nombre d'animaux par groupe, des analyses statistiques seront conduites pour s'assurer de la fiabilité des observations. Un autre élément permettant de réduire le nombre d'animaux est l'effort porté sur leur homogénéité : pour cela la démarche commence dès l'approvisionnement auprès d'éleveurs et fournisseurs agréés, mais surtout par la maîtrise tout au long de leur vie de bonnes conditions d'environnement et d'entretien (alimentation adaptée, contrôle de la température des locaux, surveillance vétérinaire...).

Raffiner : Les lapins bénéficient d'un programme d'enrichissement, avec notamment à leur disposition, un rondin végétal, un bâton de bois. En ce qui concerne le raffinement des procédures, nous veillerons aux techniques d'administration pour réduire l'inconfort des animaux et nous appliquerons des points limites précoces pour réduire la souffrance en cas de produits présentant une toxicité. La douleur sera prévenue avec une anesthésie et une analgésie appropriée, sous supervision vétérinaire constante. Une démarche qualité rigoureuse, une supervision de chaque lot d'étude par le directeur d'étude concerné, ainsi que des bilans réguliers impliquant les techniciens, permettront d'appliquer toute alternative respectueuse du bien-être animal. L'étroite collaboration des Directeurs d'études et de la Structure de Bien-Être Animal aura pour objectif de réduire les dommages en respectant la règle des 3R.

12805 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la 2ème cause de mortalité dans le monde. L'AVC ischémique (80% des AVC) est dû à l'occlusion d'une artère cérébrale, le plus souvent par un caillot sanguin. Il induit non seulement une perte de neurones, mais aussi des lésions des vaisseaux qui peuvent conduire à des hémorragies intracérébrales, hémorragies qui aggravent l'état neurologique des patients et sont responsables de décès. Le seul traitement médicamenteux actuellement disponible pour les AVC ischémiques est l'administration du rt-PA (activateur tissulaire du plasminogène recombinant) qui détruit le caillot sanguin et permet ainsi au sang de circuler de nouveau dans l'artère. Cependant, le rt-PA aggrave le risque d'hémorragies intracérébrales. Il est donc urgent de développer des stratégies qui puissent limiter les hémorragies chez les patients souffrant d'AVC ischémiques traités ou non par le rt-PA.

Au cours de l'AVC ischémique, de multiples mécanismes interviennent dont le stress oxydant qui correspond à un excès de radicaux libres. Le stress oxydant est toxique non seulement pour les neurones mais aussi pour les vaisseaux car il contribue à la survenue des hémorragies.

Afin de réduire ce stress oxydant, les nanoparticules d'oxyde de cérium (NPC), composés antioxydants possédant des capacités d'auto-régénération, pourraient être particulièrement intéressantes dans la prise en charge de l'AVC ischémique. Afin de pouvoir être administrées, ces nanoparticules doivent être recouvertes. Dans le présent projet, des recouvrements innovants ont

été élaborés. De plus, afin d'augmenter l'efficacité des NPC, des molécules seront greffées à leur surface afin de cibler spécifiquement les vaisseaux susceptibles de développer des hémorragies.

L'objectif de notre projet est donc d'évaluer l'effet protecteur de ces composés antioxydants innovants après une ischémie cérébrale chez la souris vis-à-vis des hémorragies spontanées ou liées à l'administration du rt-PA.

Une partie du programme de recherche est réalisée in vitro sur des cultures de cellules endothéliales cérébrales (cellules constituant les vaisseaux sanguins cérébraux) afin d'étudier la capacité anti-oxydante des NPC ; ceci permet de remplacer et de réduire le nombre d'animaux utilisés pour nos études. Ces travaux in vitro nous permettront in fine de retenir le composé le plus efficace parmi la collection de nanoparticules qui a été constituée. Pour la partie in vivo, nous testerons l'efficacité du composé retenu, avec ou non greffage en surface d'une molécule permettant le ciblage des vaisseaux en souffrance.

Les souris seront anesthésiées puis soumises à une ischémie cérébrale. Deux modèles seront utilisés : un modèle d'ischémie permanente et un modèle transitoire, ce qui reproduit la réalité clinique des AVC ischémiques qui peuvent être permanents ou transitoires. Cette étude est ainsi en accord avec les recommandations émises par les scientifiques spécialistes des AVC qui préconisent de mener les études de neuroprotection sur ces deux types de modèles. Les NPC seront administrées à 3 doses différentes et leur effet sur le volume de lésion et les hémorragies intracérébrales sera évalué par IRM. Les souris seront ensuite euthanasiées et leurs cerveaux prélevés afin de localiser les NPC au niveau cérébral.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Une partie du projet est validée par des approches cellulaires mais l'ischémie cérébrale met en jeu des mécanismes à l'échelle de l'organisme entier, rendant indispensable une approche in vivo sur l'animal.

Réduire : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, le stress oxydant sera étudié sur la dose optimale de NPC. Les études seront réalisées sur des souris (730 souris au total pour un projet réalisé en 5 ans).

Raffiner : Des points-limites ont été établis entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Afin de prévenir toute douleur qui pourrait être associée aux modèles, les animaux seront traités par un antalgique deux fois par jour. Les animaux ischémiques seront traités ou non par le rt-PA.

A terme, les résultats de ce projet permettront de développer de futures thérapeutiques pour le traitement des patients victimes d'AVC.

12806 Le transfert d'embryon est une méthode couramment utilisée en élevage équin afin de permettre à certaines juments d'avoir une descendance sans pour autant mener une gestation à son terme. Ainsi, cette méthode, basée sur le principe de « mère porteuse », permet par exemple d'éviter une gestation à une jument âgée, de valoriser son patrimoine génétique à haut potentiel sans avoir d'impact sur sa carrière hippique. Néanmoins, les taux de succès d'un transfert restent faibles (50%).

Notre objectif, de par notre expérience, est de tenter d'améliorer ce pourcentage via l'application d'une crème anesthésiante sur le col de l'utérus des juments avant la réalisation du transfert afin de court-circuiter certains reflexes neuroendocriniens du col de l'utérus pouvant induire des échecs de gestation.

Pour notre protocole, nous utiliserons 40 juments réparties en deux groupes : receveuses et donneuses. Le groupe donneur (N=30) suivra le protocole classiquement utilisé par les vétérinaires pour produire des embryons équins. Le groupe receveur (N=10) suivra le protocole classiquement utilisé par les vétérinaires pour le transfert des embryons équins sur un cycle et suivra une seconde fois ce protocole sur un deuxième cycle avec l'ajout de notre crème anesthésiante.

Notre expérience se fera dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer : A l'heure actuelle l'optimisation du transfert chez les équins ne peut pas être fait via des approches in vitro. L'évaluation du succès d'une gestation nécessite obligatoirement l'emploi d'un organisme vivant.

Réduire : Pour réduire au maximum le nombre d'individus utilisés nous avons fait le choix d'un protocole expérimental utilisant le même animal pour effectuer le traitement (utilisation d'anesthésiant) et le contrôle (protocole classique de transfert). L'animal est donc son propre témoin.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales (paille et foin de qualité, soins quotidiens) sur leur lieu d'élevage. La procédure de collecte/transfert sera réalisée par du personnel qualifié spécifiquement formé. Elle aura lieu dans les installations d'élevage afin de réintégrer les animaux dans leur troupeau immédiatement après la fin de la procédure et ce, afin de limiter le stress autant que faire se peut. Un enrichissement du milieu (bois à mâchonner, ballons, objets divers) est présent dans tous les paddocks. Si les animaux ne sont pas dans ces paddocks, ils sont à l'herbe.

12807 Notre animalerie aide la communauté de la recherche biomédicale à disposer de modèles précliniques permettant de comprendre le rôle et la fonction des gènes impliqués dans les pathologies humaines et particulièrement dans l'immuno-oncologie et l'immunothérapie des cancers. Nous générons, hébergeons, développons et maintenons des modèles "souris", dans nos locaux, pour nos collaborateurs. Tous les animaux en zone d'élevage chez nous, sont uniquement présents pour établir des animaux d'intérêts qui seront ensuite utilisés dans les différents protocoles les incluant en phase expérimentale.

Pour comprendre les fonctions de l'ensemble de nos gènes, il est nécessaire de générer, analyser et caractériser des modèles de souris génétiquement modifiées. Le génotypage des animaux peut être effectué à partir de différents types de prélèvements (coupe de queue, fèces, poils...), mais sa mise en œuvre ne présente un intérêt que pour un individu identifié. La résection de la dernière phalange peut techniquement être réalisée sur un souriceau nouveau-né dès l'âge de 5 jours et de façon optimale au 7ème jour. Considérant qu'elle fournit également un prélèvement tissulaire exploitable pour le génotypage, elle offre l'opportunité de réaliser une identification et un génotypage tout en n'effectuant qu'une seule intervention précoce sur l'animal. De nombreuses études scientifiques sur le comportement des souriceaux, ainsi qu'à l'âge adulte, démontre que cette procédure ne génère pas de douleur et n'engendre pas de modification comportementale ou physiologique chez l'adulte. Elle est donc la moins stressante et impactante sur le comportement des procédures de marquages lorsqu'elle est effectuée par un personnel formé et dans une fenêtre temporelle précise.

Dans le cadre de nos activités d'élevage et de production d'animaux, nous utilisons cette méthode, recommandée par la FELASA, qui consiste à l'identifier ET génotyper de façon précoce les souris. Cette procédure d'identification et de génotypage combinés permet de sélectionner les animaux présentant le génotype recherché de manière précoce (avant sevrage) et ainsi de réduire le nombre d'animaux élevés et limiter les euthanasies tardives. Elle favorise également la constitution précoce de lots d'animaux homogènes, réduisant ainsi le risque d'agressivité entre les animaux. C'est notamment pour ces raisons et en l'absence d'effet négatif à court et long terme sur le comportement ou le bien-être des animaux que cette technique est actuellement recommandée par des groupes d'experts européens. En effet, de nombreuses études scientifiques sur le comportement des souriceaux, ainsi qu'à l'âge adulte, démontrent que cette procédure ne génère pas de douleur et n'engendre pas de modification comportementale ou physiologique chez l'adulte. Elle est donc la moins stressante et impactante sur le comportement des procédures de marquages lorsqu'elle est effectuée par un personnel formé et dans une fenêtre temporelle précise.

Pour l'identification et le génotypage des lignées produites chaque année et le développement de celles-ci, qui font l'objet de cette demande d'autorisation (DAP), nous estimons le nombre d'animaux dans ce projet à 30 000 souris maximum pour les 5 ans du projet. Au sein de notre animalerie dans le but de respecter la règle des 3 R, nous avons mis en place un suivi journalier des animaux, une prise en charge spécifique de la douleur lors des chirurgies et en suivi post-chirurgical mais

également lors du suivi quotidien si nécessaire. De plus, un enrichissement renouvelé toutes les semaines incluant 3 enrichissements différents (Twister en papier, cylindres en coton et nid en papier) sur des cycles de trois semaines est en place dans l'animalerie et le nombre d'animaux est calculé par des tests statistiques permettant de réduire à minima le nombre d'animaux utilisés par ces procédures.

12808 La rage est une maladie responsable de plus de 60 000 décès par an dans le monde. Bien qu'elle ait été éradiquée complètement de la France métropolitaine depuis 2001, elle sévit toujours en Asie, en Afrique et en Amérique du Sud. Il est aujourd'hui encore impossible de détecter cette maladie avant ses premiers signes cliniques. Or une fois ces derniers déclarés, aucun traitement ne peut enrayer l'évolution de la maladie vers la mort. Il existe un vaccin contre la rage, efficace uniquement en médecine préventive. Il est donc important de trouver un moyen de guérir les patients une fois les symptômes survenus. Le virus se transmet à l'Homme en général par morsure d'un animal infecté. La phase asymptomatique correspond au temps nécessaire au virus pour atteindre les cellules cibles, les neurones, causant leur détérioration et entraînant une paralysie qui mène à la mort par arrêt du fonctionnement du cœur et des poumons.

Les études sur des systèmes *in vitro* ou utilisant des modèles murins de la rage n'ont pas apporté de données suffisantes pour le développement d'un traitement curatif. Un modèle préclinique, *in vivo*, plus pertinent est essentiel pour tester de nouvelles approches curatives. Le primate non humain est particulièrement bien adapté, sa proximité génétique avec l'Homme entraînant de nombreuses similitudes au niveau du système immunitaire et du système nerveux. Ainsi, la transposition de ce modèle à l'Homme de stratégies basées sur le blocage du virus par des anticorps thérapeutiques sera plus immédiate parce que exactement les mêmes procédures, les mêmes médications et les mêmes outils de suivi de l'infection et de l'efficacité du traitement pourraient être utilisées.

Notre objectif est de développer un modèle d'infection des primates non humains par le virus de la rage afin d'évaluer une nouvelle thérapie curative (anticorps monoclonal humain antirabique). Le virus sera injecté par voie musculaire afin de mimer une morsure. Les paramètres cliniques, biologiques et le comportement des animaux sera suivi afin de caractériser la physiopathologie de l'infection et d'identifier les premiers symptômes de la maladie ainsi que leurs degrés et leurs variabilités. Une fois le modèle caractérisé, des animaux infectés recevront un traitement antirabique (Anticorps monoclonal humain) dès que l'apparition des symptômes afin d'évaluer son efficacité. Ce traitement a déjà été montré son efficacité dans des modèles *in vitro* et des modèles murins mais qui ne reproduisent pas la physiopathologie de la maladie.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Utiliser un modèle *in vivo* est essentiel pour réaliser des études précliniques pour tester l'efficacité d'un traitement curatif de la rage est indispensable.

Réduire : Cette étude prévoit le recours à 50 Primates Non Humain, nés et élevés en captivité dans des élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité statistique des résultats.

Raffiner : L'état de santé des animaux sera étroitement surveillé au quotidien tout au long de l'expérience. Toutes les manipulations sur les animaux seront effectuées sous anesthésie, des protocoles d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire afin de minimiser la douleur à chaque intervention et des critères d'arrêt sont prévus en cas d'effets inattendus.

12809 L'imagerie scintigraphique est une méthode d'imagerie qui permet de mieux comprendre la physiopathologie des maladies et d'aider à leur diagnostic grâce à l'utilisation de traceurs radioactifs. Ces molécules radioactives vont se fixer à une cible que l'on veut détecter dans le corps d'un sujet et la radioactivité permet leur détection et quantification à l'aide d'une caméra. Depuis plusieurs années, des traceurs radioactifs permettant d'explorer la neuroinflammation ont été synthétisés dont le DPA-714 marqué au fluor 18. Ce traceur radioactif a été utilisé dans plusieurs publications en clinique et chez l'animal et s'avère être un outil de choix pour explorer l'implication

de la neuroinflammation dans de nombreuses maladies psychiatriques. Néanmoins, l'interprétation de ces études reste limitée car aucune méthode de quantification n'a été développée, limitant l'analyse des données à une évaluation de la fixation du traceur dans différentes zones du cerveau. Le développement d'une méthode de quantification doit d'abord être réalisée chez l'animal et nécessite d'évaluer la cinétique du traceur radioactif dans un compartiment de fixation non spécifique (qui ne contient pas la cible à laquelle se fixe le traceur). Le compartiment non spécifique par excellence est le sang, il est donc nécessaire d'évaluer la cinétique du traceur radioactif dans le compartiment sanguin ce qui nécessite la réalisation d'une fonction d'entrée artérielle.

L'objectif de ce projet est donc (1) l'évaluation de la cinétique du traceur radioactif dans le compartiment sanguin à l'aide d'un système dédié, et (2) l'utilisation de ces données pour le développement d'une méthode de quantification qui sera validée à partir d'images du traceur réalisées sur des animaux témoins et expérimentaux présentant une neuroinflammation induite par une injection de lipopolysaccharide (LPS).

Cette expérimentation a été établie dans le respect de la règle des 3 R:

Remplacement : Ce type d'étude ne peut être substitué par une méthode alternative *in vitro* ou sur cellules car l'objectif final est d'utiliser ces mêmes traceurs en imagerie clinique.

Raffinement : la perte en volume sanguin engendrée par les prélèvements sanguins est entièrement maîtrisée par le manipulateur. De plus, les animaux seront hébergés par deux par cage en présence d'un enrichissement comprenant un tunnel en plastique et du papier absorbant. Toutes les stratégies d'analgésie, d'anesthésie et de soin seront mises en œuvre pour réduire au maximum tout inconfort qui pourrait être induit par le modèle.

Réduction : Le nombre d'animaux est réduit d'environ 50% : le système dédié pour évaluer la cinétique du traceur permet d'obtenir des mesures toutes les secondes. Sans ce système, du sang devrait être prélevé toutes les secondes ce qui conduirait à une instabilité hémodynamique. Cette instabilité induirait une diminution de la perfusion du radiotraceur dans le sang et donc modifierait sa cinétique réelle. Ces facteurs font qu'il est difficile de répéter les prélèvements sanguins pour générer la fonction d'entrée artérielle chez un même animal. Il faudrait répéter le nombre d'expériences. Pour cette étude nous aurons besoin de 50 rats pour l'ensemble du projet sur 3 ans.

12810 Le cancer du pancréas est la quatrième cause de mortalité par cancer dans le monde. Asymptomatique et métastatique, il n'existe à l'heure actuelle aucun moyen de le dépister à un stade précoce et au moment du diagnostic, l'espérance de vie du patient excède rarement 6 mois. L'urgence à laquelle la recherche est confrontée nous a amené à développer de nouveaux agents d'imagerie pour imager et dépister le cancer du pancréas.

Après une étude minutieuse *in vitro*, une nano-formulation d'agents d'imagerie basée sur des dendrimères ayant de nombreuses applications en biologie a été sélectionnée pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Les dendrimères sont des molécules de grande taille présentant des ramifications ressemblant à des branches d'arbres d'où leur nom. Les dendrimères ont la capacité de s'assembler et de former des structures sphériques appelées micelles dont la cavité peut servir à véhiculer un agent thérapeutique.

Il est primordial de tester *in vivo* l'efficacité et la sensibilité de ces nano-agents d'imagerie médicale qui pourraient être utilisés dans le dépistage/diagnostic, et le suivi des tumeurs pancréatiques, voire dans la délivrance ciblée d'un traitement si ces agents d'imagerie incorporaient dans leur cavité une molécule anti-cancéreuse (application dite théranostique permettant à la fois le diagnostic par imagerie et le traitement).

Dans ce but, des souris saines seront utilisées pour évaluer la toxicité de ces agents ainsi que leur bio distribution dans l'organisme des animaux. Nous injecterons des cellules tumorales humaines à des souris NMRI NUDE afin de générer des xénogreffes à partir de cellules tumorales humaines qui seront ensuite explorées après injection intraveineuse d'un nano-agent de contraste, par imagerie par IRM, une méthode non-invasive utilisée en clinique permettant le suivi longitudinal d'un même sujet. Il sera ainsi possible de vérifier que le produit est retenu par les tumeurs pancréatiques à différents stades de développement et qu'il permet de détecter de façon précoce et spécifique les

tumeurs. Le projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R. Nous avons tenté d'utiliser toutes les méthodes substitutives possibles notamment les approches cellulaires, mais nous ne pouvons nous passer du recours à l'animal. Nous réduirons le nombre d'animaux grâce à l'utilisation de tests statistiques permettant d'optimiser la taille des effectifs, et nous raffinerons les procédures en diminuant autant que possible le stress et la douleur des animaux. Le nombre total d'animaux pour ce projet est estimé à 35 souris. L'implantation des tumeurs comme la procédure d'imagerie seront réalisées sous anesthésie afin de réduire le stress et la douleur des animaux. Nous utiliserons des doses à faible impact neurologique afin de préserver le bien-être des animaux tout en évaluant l'efficacité et la sensibilité de nos nano-agents dendrimères pour l'imagerie. Des points limites spécifiques et des critères d'arrêt ont été définis.

Un délai d'acclimatation et une habitude à l'expérimentateur seront assurés. Le raffinement portera également sur les conditions d'hébergement (groupes sociaux, cycle jour/nuit, nourriture et boisson ad libitum) et l'enrichissement environnemental. Les souris seront hébergées dans des cages contenant des rondins de bois à ronger et un refuge afin de diminuer les comportements agressifs et réduire l'ennui, et favoriser l'expression d'un maximum de comportements naturels (interactions sociales, locomotion, élimination, marquage, repos, recherche de cachette...).

12811 Dans les dernières décennies, l'obésité a considérablement augmenté dans les pays industrialisés et est responsable de nombreuses pathologies (diabète, hypertension, atteintes vasculaires...). L'homéostasie énergétique est une composante importante de cette affection, l'augmentation de l'apport énergétique et/ou la diminution de la dépense énergétique sont impliquées dans son développement.

L'utilisation de souris mutantes permettra d'étudier les gènes impliqués dans le contrôle de la dépense énergétique et de mieux comprendre les mécanismes et de trouver de nouveaux traitements, les thérapeutiques actuelles visant à cibler le tissu adipeux et son rôle dans la dépense énergétique.

REMPACEMENT:

L'utilisation de l'animal est indispensable car les interactions entre les différents organes impliqués dans le métabolisme ne peuvent être remplacées par des techniques in vitro. De plus, la souris étant l'espèce dans laquelle les mutations génétiques sont les mieux maîtrisées à l'heure actuelle, elle est le modèle de choix pour l'étude des gènes impliqués dans la dépense énergétique.

Le but du projet est de mettre en place un test de nourriture apparié sur un nouvel équipement de mesure de calorimétrie indirecte. La dépense énergétique étant fortement dépendante de la prise alimentaire, il est important dans certains cas de s'assurer que la consommation de nourriture est identique entre les groupes d'études afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués. Par exemple si une mutation ou un traitement entraînent une augmentation (ou une diminution) de la prise alimentaire, il faudra étudier la dépense énergétique en soumettant les 2 groupes d'étude (contrôles et mutants ou traités) à la même prise alimentaire.

REDUCTION:

Afin de valider les protocoles et de tester des modèles d'intérêt, des souris sauvages C57BL/6N ainsi que 4 modèles de souris génétiquement modifiées (gènes connus pour être impliqués dans la dépense énergétique ou gènes d'intérêt identifiés au cours de l'exploration systématique dans le cadre d'un consortium international) seront utilisées. Notre expérience a montré qu'en vue de la variabilité des mesures un nombre minimum de 9 souris par groupe est nécessaire pour une analyse statistique des données. Le nombre total de souris sera de 144 (9 souris / groupe, mâles et femelles).

RAFFINEMENT:

Le nouvel équipement qui sera utilisé est constitué de cages de mesure de dépense énergétique par calorimétrie indirecte (mesure de la consommation d'oxygène et de la production de dioxyde de carbone). Afin de minimiser le stress des animaux, ces cages sont identiques aux cages d'hébergement. Dans les conditions de mesures habituelles, mis à part l'isolement de l'animal (1 animal / cage) la souris n'est soumise à aucun stress particulier et évolue librement dans son

environnement habituel. Le test de nourriture apparié peut cependant générer un stress pour le groupe qui subira une diminution de son apport alimentaire. Toutefois l'apport alimentaire correspondra à celui d'un groupe de souris sauvages contrôles du même âge et ne consiste donc pas en une privation drastique.

Nous n'attendons pas de symptômes dommageables chez ces souris. Cependant, le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état général des animaux.

12812 Notre établissement est doté d'une plateforme d'imagerie spécialisée en expérimentation du petit animal (rat, souris, lapins et cobayes).

Plusieurs équipements sont à disposition : un Imageur par Résonance Magnétique (IRM) offre une technique non-invasive qui permet une vue en deux ou trois dimensions de l'intérieur de l'organisme, un microscanner (μ CT) qui est une technique non-invasive utilisant les rayons X permettant d'obtenir une image en trois dimensions d'un animal et un échographe, proposant une technologie par ultrasons doppler non-invasive.

Ces trois techniques permettent également de réaliser des études anatomiques (évolution d'un organe ou d'une pathologie), physiologiques (le fonctionnement biologique d'un organisme ou d'un organe), pharmacologiques (le suivi cinétique de la fixation d'une molécule). Ces techniques d'imagerie, de par leur caractère non-invasif, permettent en effet de réaliser des suivis chroniques sans avoir recours à des chirurgies lourdes des animaux, réduisant ainsi considérablement le nombre d'animaux nécessaire dans chaque groupe et la douleur lors des protocoles expérimentaux.

La présente demande a pour objectif de permettre à d'autres établissements utilisateurs d'accéder aux équipements et aux compétences de notre Institut en matière d'imagerie non invasive sur petit animal.

Dans un souci permanent de diminuer le nombre d'animaux utilisés pour les expériences, il sera toujours proposé des solutions alternatives (REPLACEMENT) aux porteurs des projets (simulations, tests sur phantoms) pour affiner le protocole expérimental. Afin de garantir leur bien-être, les animaux seront manipulés par des personnes compétentes et formées, les hébergements contiendront un enrichissement et les hébergements collectifs seront maintenus dans la limite de ce qui sera permis par les projets. Toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale (mise en œuvre et surveillée par du personnel dédié) avec un monitoring cardiaque, respiratoire et suivi de température pendant l'acquisition d'images et une analgésie adaptée sera mise en place si cela est nécessaire en fonction de la procédure. Des critères d'alerte précis seront surveillés : si l'animal présente un signe d'appel, des mesures adaptées sont mises en place immédiatement (ajout d'analgésique par exemple) afin de garantir le bien-être des animaux (RAFFINEMENT).

Un nombre optimal d'animaux (REDUCTION), en fonction des tests statistiques de chaque projet, sera utilisé pour garantir la qualité des résultats. Il a été estimé un nombre d'animal par espèce de : 900 rats, 480 souris, 240 cobayes et 240 lapins.

12813 Le stress correspond à l'ensemble des réponses d'un organisme soumis à des pressions ou contraintes de la part de son environnement. Ce stress peut avoir des conséquences au niveau phénotypique (e.g. perte de poils), au niveau comportemental (e.g. comportements stéréotypés d'un animal en cage) ou encore au niveau physiologique (e.g. diminution de la capacité de la réponse immunitaire). Il est aussi possible de mesurer directement l'hormone de stress produite par les glandes surrénales. A l'heure actuelle chez les oiseaux, de telles mesures s'effectuent sur des échantillons de sang pris au niveau de la veine alaire, dans la jugulaire ou dans les pattes, cette dernière méthode est considérée comme la meilleure sur les jeunes poussins. Lors ce projet, nous souhaitons déterminer si la mise en place d'une stratégie anti prédateur impliquant l'émission de cris de harcèlement peut avoir un impact chez un passereau commun, la mésange charbonnière *Parus major*. Nous mesurerons à la fois le niveau de l'hormone de stress des parents exposés expérimentalement à des signaux de harcèlement ainsi que leurs comportements parentaux

(nourrissage des jeunes). Nous chercherons également à déterminer si ce type d'impact sur les adultes peut impacter la croissance des poussins.

Afin de pouvoir travailler sur une espèce sauvage d'oiseau protégée en ayant un minimum d'impact, nous souhaitons développer une technique peu invasive de mesure du stress. Une solution serait de développer et valider une méthode de dosage de la corticostérone à partir d'un prélèvement de salive. Ce travail sera fait à partir de 16 mésanges charbonnières adultes et nous nous assurerons de la fiabilité de ces données en les comparant aux résultats obtenus à partir d'une prise de sang. Si cette technique de raffinement peu invasive se révèle satisfaisante, elle sera utilisée pour l'ensemble de notre étude portant sur la mésange charbonnière. Nous sommes dans une démarche de réduction, raffinement et de remplacement puisque nous voulons utiliser le nombre minimum d'individus (correspondant aux poussins vivants dans 40 nichoirs. Ce nombre étant variable selon les années, 120 poussins seront suivis dans le cas d'une mauvaise année et 360 si l'année est bonne) pour obtenir des résultats et ainsi avoir une puissance statistique valable. Ce nombre correspond à ce qui est classiquement utilisé dans les études de ce type et au vu du taux de mortalité des poussins, nous devons nous assurer du suivi d'au moins deux individus dans chaque nichoir durant toute l'étude. Au total, le nombre d'animaux sera donc au maximum de 376 animaux.

12814 Les maladies du système musculosquelettique touchent une large proportion de la population, que ce soient des maladies génétiques affectant le développement et la croissance osseuse, les cancers, les maladies dégénératives liées au vieillissement telles que l'ostéoporose et l'arthrose ou encore les défauts de régénération suite à un traumatisme. Le traitement actuel des non-consolidations et des grands défauts osseux est la transplantation d'autogreffe osseuse (avec ses limites) tandis que les stratégies de réparation osseuse par thérapie cellulaire actuellement envisagées reposent sur l'utilisation de cellules souches squelettiques dérivées de la moelle osseuse avec des résultats encore insatisfaisants. Nos recherches visent à mieux comprendre le processus de formation et de régénération osseuse afin de mettre au point de nouvelles applications thérapeutiques pour les maladies et la réparation du système musculosquelettique. Le but de nos projets est d'identifier les sources de cellules souches participant à la formation et la réparation osseuse, et grâce au développement de marqueurs génétiques chez la souris, de déterminer les mécanismes de recrutement et de différenciation des cellules souches osseuses pendant le développement et la régénération tissulaire normale ou pathologique.

La réparation osseuse a lieu dans un environnement tissulaire complexe impliquant des interactions entre l'os, les vaisseaux, les nerfs, les tissus mous adjacents tel que le muscle. Expérimentalement, il n'est pas possible de reproduire la complexité de cet environnement dans un système cellulaire *in vitro* ou par modélisation mathématique. C'est pourquoi nous utilisons des modèles animaux nécessaires à la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de la régénération osseuse. D'autre part, l'étude du potentiel de régénération des cellules souches osseuses, par des approches de transplantation cellulaire et greffe tissulaire, pourra constituer un ensemble de données précliniques pour de futures applications thérapeutiques, et pour lesquelles l'utilisation de modèles animaux est nécessaire.

Le processus de régénération osseuse est spontané. Le cal est formé en une semaine stabilisant la fracture. Les animaux sont guéris après 3 semaines lorsque le cal est entièrement ossifié. Toutes nos expérimentations sont pratiquées sous anesthésie accompagnée d'une analgésie. Les animaux reçoivent 3 doses d'analgésique après opération, et sont suivis quotidiennement jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Compte tenu de l'état actuel de nos connaissances sur le rôle des cellules souches osseuses et les différentes voies de signalisation impliquées dans la régénération osseuse, nous avons établi le nombre exact de groupes expérimentaux et d'échantillons nécessaires pour atteindre nos objectifs tout en respectant la règle des trois R. Notre longue expérience dans ce domaine de recherche et dans l'utilisation des modèles murins nous permet de définir précisément le nombre minimum de souris (=1940) nécessaires aux tests statistiques requis, tout en limitant le nombre total d'animaux, en réduisant les temps de prélèvements et en regroupant les animaux contrôles.

12815 Les fentes du palais (ou fentes palatines) font partie des anomalies de la face les plus fréquentes chez l'homme, et chez les autres mammifères. Cette malformation se traduit par une fissure du palais, aboutissant à une communication anormale entre la bouche et le nez. Chez l'homme et chez certains animaux domestiques, une reconstruction chirurgicale du palais est généralement possible. En revanche, chez les animaux d'élevage, cette anomalie est très invalidante, car elle empêche les animaux de se nourrir correctement en raison de la communication entre la bouche et le nez. Les risques de « fausse-route » et d'étouffement sont élevés, notamment avec la nourriture liquide (le lait étant la nourriture exclusive en début de vie).

Des mutations responsables de fentes palatines ont déjà été décrites dans de nombreux gènes chez l'homme et la souris notamment, mais certains cas restent encore à élucider. Récemment, on a identifié une nouvelle mutation, dans un gène non associé jusque-là aux fentes palatines, grâce à une étude chez les bovins.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Nous voulons confirmer l'implication de ce gène dans les fentes du palais chez le bovin et étudier son rôle dans le développement du palais et dans le développement cranio facial en général. La compréhension du rôle de ce gène présente en effet un intérêt pour la santé humaine. Comme le développement du crâne et de la face résulte de l'interaction complexe entre des tissus différents, il n'existe pas de méthode substitutive à l'utilisation d'un modèle animal. Nous avons donc choisi de modéliser l'anomalie bovine chez la souris, en produisant deux lignées transgéniques.

Sur ces lignées transgéniques, on vérifiera d'abord si les souriceaux mutés présentent une fente du palais à la naissance, et on caractérisera finement les différences de développement du crâne avec les souriceaux sauvages. Puis, si la fente du palais est confirmée, on étudiera le développement du palais chez des fœtus entre 11 jours et demi et 15 jours et demi de gestation, période pendant laquelle le palais se forme chez la souris. L'objectif est de comprendre le rôle du gène concerné dans la formation du palais.

Réduire : Au total, ce projet utilisera environ 290 souris sur 5 ans, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Raffiner : Dès la naissance, les souriceaux sont surveillés au moins deux fois par jour, et on vérifiera qu'ils s'alimentent correctement, en regardant par transparence la présence de lait dans l'estomac. Pour minimiser la souffrance éventuelle due à une alimentation insuffisante, les souriceaux qui auront l'estomac vide seront euthanasiés. Ce sera notre critère d'arrêt de l'expérience. Les souris bénéficieront dans chaque cage d'un enrichissement de leur milieu (sopalin...). Les animaux seront élevés en groupe pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience, afin d'intervenir rapidement et de manière appropriée si un problème était constaté.

12816 Des données de plus en plus nombreuses indiquent que nombre de protéines impliquées dans le développement tumoral sont également des régulateurs importants du métabolisme. Notre projet vise à comprendre les fonctions métaboliques de 3 acteurs importants de la genèse de tumeurs qui agissent au sein de la même cascade moléculaire: le suppresseur de tumeurs p53, l'oncogène MDM2 et la protéine multifonctionnelle E4F1. Nos données obtenues sur des cellules en culture ainsi que celles de la littérature montrent que ces 3 protéines sont des régulateurs importants du métabolisme. Notre objectif est maintenant d'évaluer les rôles respectifs de ces 3 protéines dans le métabolisme du foie et d'en évaluer l'interdépendance dans le contexte d'un organisme entier. Pour répondre à cette question, nous utiliserons différents modèles murins génétiquement modifiés afin d'évaluer les conséquences de l'inactivation d'un ou plusieurs de ces gènes dans les cellules de foie. Nous évaluerons à la fois les effets directs de l'inactivation de ces gènes sur le fonctionnement du foie mais également les conséquences métaboliques indirectes sur d'autres tissus tels que le tissu adipeux, les muscles, ou le pancréas. Les tests métaboliques réalisés sur ces groupes expérimentaux (320 souris au total) seront réalisés dans le respect strict de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R sont les suivantes :

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation. Nous avons prévu d'utiliser un nombre minimum mais suffisant d'animaux pour garantir la puissance statistique de nos résultats expérimentaux. Par ailleurs, chacun de ces animaux sera analysé du point de vue métabolique de la façon la plus exhaustive possible (plusieurs tests métaboliques seront réalisés sur chaque animal afin d'en limiter le nombre).
- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la mise en place de points limites (critères d'interruption) et le suivi du bien-être de nos animaux de façon quotidienne. Nos animaux seront élevés dans un milieu enrichi (litière mélangée à des copeaux et briques de peuplier). Une attention particulière sera portée aux animaux qui seront prédisposés au développement tumoral du fait de la manipulation génétique subie.
- « Remplacer » les modèles animaux : Il n'existe à ce jour aucun modèle d'étude in vitro permettant de modéliser la complexité des interactions métaboliques à distance entre tissus. De fait, cette étude doit obligatoirement être réalisée in vivo chez l'animal.

12817 Le cancer est un terme général désignant toute maladie pour lesquelles certaines cellules du corps humain se divisent d'une manière incontrôlée. Le nombre de nouveaux cas estimés en 2015 est de 385 000 en France métropolitaine, tandis que sa mortalité est estimée à 149 500 décès. Dans ce contexte, il existe différents types de traitements qui peuvent être utilisés. La chimiothérapie est un traitement médicamenteux qui agit par voie générale, c'est-à-dire qu'elle agit sur les cellules cancéreuses dans l'ensemble du corps. Ce mode d'administration présente deux inconvénients : une toxicité associée et une élimination rapide des molécules. Pour pallier ces 2 effets délétères, des formulations galéniques peuvent être utilisées afin d'augmenter la durée d'action des chimiothérapies et de réduire les effets secondaires associés.

Des formulations de principe actif (PA) composant les chimiothérapies ont été développées depuis plusieurs années. Afin de déterminer leur intérêt, ce projet propose de comparer l'efficacité in vivo de l'effet anti tumoral des chimiothérapies seules à celle des mêmes PA formulés. De plus une méthode physique (HIFU) de libération locale des PA sera utilisée en association afin d'optimiser les conditions de délivrance des chimiothérapies au niveau de la tumeur. Pour cela, seul un système complexe tel l'animal peut permettre de répondre à cette question.

La souris est le meilleur modèle animal permettant d'étudier l'efficacité anti-tumorale d'un PA. Nous évaluerons le retard de croissance de tumeurs induites en sous-cutanée chez la souris BALB/cJRj après injection par voie intraveineuse de différentes formulations seules ou en association avec les HIFU. Nous utiliserons comme contrôle des PA dans leur forme d'administration utilisée chez l'homme. L'injection de cellules tumorales en sous cutanée ainsi que la procédure d'application des HIFU seront réalisés sous anesthésie gazeuse.

Les souris porteuses de tumeur induites par injection sous cutanée recevront les formulations de PA deux fois par semaine pendant 2 semaines par voie intraveineuse, pour certains groupes les HIFU seront appliqués 6h après injection des PA. Puis à différents temps une imagerie non invasive de la croissance tumorale sera effectuée par imagerie optique sous anesthésie. Les souris seront observées jusqu'à atteinte de points limites nécessitant une décision de mise à mort, les organes seront prélevés pour effectuer une analyse histologique. Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera 330 souris. Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Nous avons en effet préalablement évalué par des études in vitro plusieurs formulations pour ne tester chez l'animal que les formulations finales, ce qui nous a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. Une grille d'évaluation de la douleur adaptée à ce projet a été élaborée pour surveiller l'état général de l'animal, son apparence, son comportement, révélateurs du niveau de douleur et définir de critère d'arrêt des souffrances. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité et un niveau de douleur trop élevé entraînera l'euthanasie anticipée de l'animal.

Ainsi, grâce à ces études d'efficacité anti tumorale nous pourrions identifier des formulations de PA efficace et moins toxique que les PA non formulés et associés ou non à la méthode HIFU, ce qui pourrait permettre le développement de nouveaux protocoles thérapeutiques.

12818 La réduction et/ou la suppression du stress lié à la contention des animaux lors des procédures expérimentales fait partie du raffinement des pratiques nécessaires à la mise en œuvre des protocoles de recherche. Cette optimisation des procédures contribue également à la récolte de données expérimentales plus robustes car non biaisées par ce stress. Dans ce cadre, le présent projet consiste à mettre en place une étude consistant à amener deux primates non humains, ici des macaques, à collaborer lors d'administrations effectuées à l'aide d'un dispositif d'injection automatisé. L'objectif de cette étude est double :

- Expérimental. Il s'agit dans le présent projet de comparer le degré d'inconfort / de contrainte engendré par l'utilisation d'un dispositif d'injection automatique calibré de deux façons différentes. L'étude consiste, à l'aide d'un renforcement positif (une friandise), à conditionner les animaux à accepter successivement des contraintes de plus en plus importantes. Il s'agira pour ces animaux d'apprendre à prendre un morceau de fruit, puis de s'habituer à une réduction ponctuelle de l'espace de déplacement, puis finalement de collaborer lors d'injections sous-cutanées lentes de petites quantités de sérum physiologique tiède. Lorsque ce dernier apprentissage sera acquis, nous observerons la réaction des animaux lors d'une injection plus rapide, à l'aide du même dispositif, et d'une quantité un peu plus importante de sérum refroidi. Ce type d'injection rapide d'un liquide froid est en effet reconnu chez l'homme comme étant légèrement plus douloureux que l'injection lente d'un liquide à température ambiante.

- Ethique, ce conditionnement opérant permettra l'amélioration des pratiques expérimentales dans de futurs projets impliquant les mêmes primates non humains.

Cette étude a été réalisée dans le passé avec deux babouins. Les résultats obtenus ici avec des macaques permettront également de comparer les performances d'apprentissages des deux espèces, sachant que le macaque est l'espèce de référence pour ce type de conditionnement. Les points clés des différents temps forts (refus, consolidation du conditionnement) des apprentissages consécutifs par les animaux seront filmés, de façon à servir dans le futur de supports d'enseignement.

Remplacement : le recours à des animaux pour ce projet de conditionnement opérant est incontournable car il s'agit d'améliorer des pratiques expérimentales qui impliquent les primates non humains en particulier (espèce cible).

Réduction : Deux animaux seulement seront intégrés dans cette étude qualitative. Il s'agit par ailleurs d'animaux réutilisés qui ont déjà participé à des protocoles expérimentaux, et seront placés une fois l'étude terminée.

Raffinement : Les macaques sont hébergés ensemble dans une grande volière de taille supérieure au maximum réglementaire ; un programme d'enrichissement hebdomadaire est mis en place dans le cadre de leur hébergement (jeux, vidéo, piscine...), ceci donnant un environnement favorable aux procédures expérimentales de conditionnement opérant ; chaque injection est précédée de l'application locale d'une pommade anesthésique permettant de réduire une éventuelle douleur due aux piqûres répétées. L'étude vise à obtenir la collaboration des animaux et à améliorer les procédures expérimentales auxquelles ces derniers seraient soumis dans de futures études. Une relation de confiance entre l'animal et le personnel affecté aux soins et à l'hébergement est propice et nécessaire à la réussite du conditionnement opérant.

12819 En France, les lésions de la moelle épinière (traumatiques ou non) représentent entre 10 et 80 cas par million d'habitants par an, soit environ 1000 nouveaux patients par an.

Les troubles du transit après lésion médullaire sont majeurs, et notamment les troubles de motricité colique. Ils représentent 15 à 30% des causes de ré-hospitalisation après une lésion médullaire, sont donc générateurs de coût de santé, et sont source de mal-être pour le patient. Les patients lésés médullaires voient ceci comme une priorité de récupération, mais la recherche n'a que peu

avancé sur ce point. Les troubles urinaires sont également invalidants après une lésion médullaire même si les systèmes de compensation de la perte de fonction urinaire sont meilleurs et permettent une prise en charge adaptée pour le patient.

Des études commencent à montrer la relation entre les troubles de motricité colique et des modifications du système nerveux entérique (SNE), des modifications du microbiote intestinal. Le type des troubles et leur intensité n'est pas là même en fonction du niveau neurologique de l'atteinte médullaire chez l'Homme, et elle s'aggrave avec le temps après l'atteinte médullaire.

La compréhension de ces troubles du transit apparaît comme un enjeu de santé majeur, et n'est pas faisable en tant que telle en recherche chez l'Homme. Nous avons malheureusement besoin d'un modèle animal de lésion médullaire chronique pour partir à la fois des troubles observés in vivo, et en faire le parallèle avec les troubles fonctionnels observables ex vivo, et également sur des études plus fondamentales protéiques ou transcriptomiques des régulateurs de motricité digestive au niveau du SNE, ou bien en immunohistochimie. Dans le contexte de la lésion médullaire, une étude des modifications vésicales en miroir des modifications du SNE sera intéressante pour la compréhension mécanistique du sujet.

Les objectifs de cette étude seront de développer un modèle murin de lésions médullaires chroniques à différents niveaux rachidiens pour en analyser les différentes conséquences fonctionnelles sur le SNE et en parallèle sur la paroi vésicale et par la suite de tester une molécule, le butyrate, qui est un acide gras à chaîne courte aux effets prokinétiques. Il est produit par un certain pool de bactéries du microbiote, et est reconnu comme étant le pool qui disparaît en cas de lésion médullaire. Le butyrate a été par ailleurs déjà testé pour la maturation du SNE dans le cadre de la prématurité ou de la maladie de Hirschprung. Nous pensons pouvoir améliorer les troubles moteurs coliques des patients blessés médullaires en utilisant cet acide gras, mais nous devons tester son efficacité au préalable avec ce modèle.

Ce projet sera réalisé en tenant compte du principe des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable (Réduire). Afin de limiter toutes sources d'angoisse et de souffrance, la réalisation du modèle de lésion médullaire sera effectuée sous anesthésie générale. Les animaux du modèle recevront de l'analgésique avant l'opération, puis 1 fois par jour pendant 3 jours, pour éviter toute souffrance. Les souris seront hébergées dans des cages de taille suffisante, munie de litière et d'élément d'enrichissement et avec un accès libre à l'eau et à la nourriture, Le bien-être des souris sera surveillé tout au long de l'étude tous les jours, en évaluant l'état général des animaux, des points limites et des critères d'arrêt seront mis en place. Si les animaux atteignent les points limites ultimes, ils seront euthanasiés (Raffiner). La corrélation in vitro-in vivo n'étant pas satisfaisante, le recours à l'utilisation de modèles animaux est indispensable dans notre étude et il n'y a pas d'alternative au (Remplacer).

Les expériences seront reproduites 3 fois de manière indépendante et ce projet nécessitera 330 animaux (souris C57Bl6) maximum dont 15 souris maximum de réforme que nous utiliserons afin d'optimiser nos gestes et nos expérimentations.

12820 Toutes les espèces, des bactéries à l'homme, sont soumises aux variations journalières et saisonnières de l'environnement. L'intégration par l'organisme des variations journalières telles que l'intensité lumineuse est à l'origine de l'expression de rythmes biologiques d'une période proche de 24 heures (rythmes circadiens). Ces rythmes biologiques sont générés de façon endogène par une horloge centrale, localisée dans le cerveau et qui permet aux êtres vivants d'anticiper les changements environnementaux journaliers. Le fonctionnement autonome de cette horloge centrale repose sur l'expression de gènes appelés gènes de l'horloge. L'activité de l'horloge centrale est synchronisée par la lumière environnementale par l'intermédiaire de la rétine et contrôle de nombreuses fonctions rythmiques (sécrétions hormonales, activité locomotrice, température, vigilance et le cycle veille/sommeil). En plus de son rôle synchronisateur de l'horloge centrale, la rétine contient également une horloge.

De nombreuses pathologies rétinienne induisent une perte partielle de la vision. Ces pathologies sont caractérisées par la dégénérescence des photorécepteurs qui altèrent donc la vision mais conduisent également à une atteinte partielle ou totale de l'information lumineuse (les aveugles en représentant le cas extrême). Nous évaluerons les conséquences de l'absence spécifique d'un type ou de plusieurs photorécepteurs sur le fonctionnement des horloges et leur réponse à la lumière en utilisant comme modèle animal la souris, déficiente en photorécepteurs. L'altération de la réception de l'information lumineuse chez ces modèles devrait conduire à des dysfonctionnements de nombreuses fonctions physiologiques des horloges de la rétine et centrale. Si cette hypothèse se vérifie, la prise en charge de patients présentant des pathologies oculaires ne devrait donc plus se limiter à la prévention des déficits visuels mais devrait également tenir compte de l'impact potentiel sur le fonctionnement des horloges circadiennes.

Notre projet de recherche vise à identifier les structures photosensibles de la rétine (photorécepteurs) responsables de la régulation par la lumière des rythmes circadiens. L'espèce animale retenue pour ce projet est la souris dont l'organisation rétinienne et la composition en photorécepteurs sont particulièrement bien étudiées. De plus, de nombreux modèles souris, modifiés génétiquement et déficients en photorécepteurs sont caractérisés et nous permettront d'analyser les processus moléculaires et cellulaires mis en jeu dans la régulation par la lumière des rythmes circadiens. Ce projet repose sur l'établissement et l'élevage de lignées par croisement de lignées préexistantes, sans phénotype dommageable (procédure 1). Nous n'attendons pas d'effet délétère sur les souris générées. Celles-ci seront ensuite utilisées pour des suivis par bioluminescence *in vitro* ou des prélèvements de tissus pour des analyses moléculaires ou biochimiques. Aucune souffrance animale n'est attendue lors de cette procédure. En parallèle, des études sont réalisées pour déterminer le rôle des bâtonnets (procédure 2). Une injection intraoculaire d'une construction non pathogène sera réalisée chez des animaux après anesthésie. Cette construction permettra la stimulation/inhibition sélective d'un type de photorécepteurs rétinien. Après récupération, les animaux seront mis à mort et des explants de tissus seront mis en culture.

Respect de la règle des 3R :

Remplacement : Des approches *in vitro* sont déjà réalisées au laboratoire. Cependant, l'utilisation de modèles complexes, i.e. d'animaux vivants, est incontournable afin d'analyser les effets de la lumière sur le fonctionnement des horloges biologiques.

Réduction : Pour réduire le nombre total d'animaux, i) nous utilisons des approches non invasives (comportement) ne conduisant pas à l'euthanasie de l'animal, ii) les animaux utilisés lors des approches non-invasives pourront être utilisés ensuite dans le cadre d'une procédure *ex vivo*, iii) plusieurs prélèvements de tissus sont réalisés chez le même animal. Nous estimons qu'un total de 450 animaux sera nécessaire

Raffinement : Dans la procédure 2, une anesthésie générale est mise en place avant l'injection intraoculaire et un analgésique est délivré après l'injection. Toute éventuelle infection oculaire sera évaluée par un examen quotidien de l'œil pendant une semaine post-injection (grille de score). Des points limites spécifique et des critères d'arrêt ont été établis.

12821 Les pathologies de l'oreille interne sont très fréquentes. Certaines molécules pourraient traiter ou améliorer les pathologies de l'oreille interne mais ne peuvent y accéder à cause de barrières anatomiques ou physiologiques puisque la cochlée est un compartiment fermé. Afin de limiter l'injection intraveineuse de doses importantes de médicaments – dont seulement une infime proportion pourrait arriver à la cochlée, l'administration directement dans l'oreille interne, pourrait être une alternative intéressante. Les nanoparticules sont utilisées comme moyen de transport dans l'oreille interne. Cela a déjà été le cas dans d'autres spécialités médicales comme en oncologie et radiologie. Les nanoparticules super-para-magnétiques présentent de nombreux avantages notamment la possibilité de les déplacer à l'intérieur même de l'oreille à l'aide d'un aimant, sans altération de l'audition.

L'objectif de notre travail est donc d'étudier avec précision les voies d'élimination de ces nanoparticules ainsi que de leur vitesse d'élimination que ce soit au niveau cochléaire ou systémique après une administration intra-cochléaire.

Douze rats Wistar adultes femelles seront nécessaires. Les deux premiers serviront à mettre en place la technique grâce à des procédures sans réveil sous anesthésie profonde et les dix suivants à l'étude principale dans laquelle l'audition des animaux sera mesurée sous anesthésie générale avant la chirurgie et à J+30.

A J0, des nanoparticules super-para-magnétiques d'oxyde de fer seront administrées à l'entrée de la cochlée. Les nanoparticules seront déplacées dans la cochlée grâce à la mise en place d'un champ magnétique externe autour de la tête du rat à l'aide d'aimants positionnés autour du crâne.

Afin d'évaluer l'élimination des nanoparticules, des prélèvements urinaires, sanguins seront réalisés à J+1, J+7 et J+30 post-opératoire sous anesthésie. Un prélèvement hépatique sera réalisé avec dosage biochimique du fer avant euthanasie, pour examen anatomo-pathologique de la cochlée au microscope.

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

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

Raffinement : l'étude est longitudinale permettant de suivre dans le temps la population de rats et ne pas procéder à des euthanasies inutiles. De plus, toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie et un protocole analgésique (antidouleur) sera mis en place suite à l'injection. Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement, en évaluant leur état général. Des points limites et des critères d'arrêt seront mis en place.

Remplacement : nous avons remplacé dès que cela était possible le modèle in vivo par des modèles in vitro notamment pour la préparation de l'étude. Néanmoins, le recours à l'animal vivant est l'étape finale et non remplaçable de ce travail.

12822 L'IRM est devenue au cours des années 1980 et 1990 un outil de plus en plus utilisé pour le diagnostic médical, grâce à sa bonne résolution spatiale (submillimétrique), son caractère non-traumatique et sa grande variété de contrastes. Ces progrès n'ont pu être réalisés sans d'importants développements méthodologiques. Afin de poursuivre ces avancées techniques, notre projet consiste à optimiser ou développer de nouvelles séquences en imagerie par RMN permettant d'obtenir in vivo des informations sur la fonction d'un organe, d'une partie d'un organe ou sur la totalité de l'organisme dans le temps et dans l'espace et de mettre en évidence des dysfonctionnements. Ces méthodes devront à terme pouvoir être utilisées en routine clinique chez l'homme.

Le projet présenté ici est basé sur le développement de séquences IRM pour la détection des signes précoces de la discopathie mécanique sur modèle murin. Chez l'homme, les discopathies entraînant des lombalgies sont très fréquentes, estimées entre 15 et 50% dans la population générale. Caractérisée par une atteinte multifocale du complexe disco-vertébral au niveau du squelette axial, la maladie se manifeste habituellement après 50 ans par un syndrome pelvi rachidien. Le retard diagnostique s'explique essentiellement par des plaintes cliniques aspécifiques évoluant par crise chez les patients.

Nous avons précédemment développé une séquence IRM permettant d'imager la plaque sous-chondrale des vertèbres de rats sains au niveau du complexe disco-vertébral pouvant répondre à différentes questions, notamment sur l'inflammation. Est-ce que l'inflammation permettrait de détecter précocement la dégénérescence du complexe disco-vertébral ? Pour répondre à cette question, nous souhaitons étudier cette plaque sous chondrale en cas d'inflammation. L'application in vivo est essentielle et l'imagerie du petit animal est indispensable pour mimer la pathologie humaine.

Pour cela, 6 rats seront utilisés. En effet, chaque rat aura 2 étages inflammés mécaniquement. Les étages adjacents serviront de contrôle. Ceci permet de limiter au strict nécessaire le nombre d'animaux. Ces animaux seront imagés par IRM plusieurs fois pour détecter l'apparition du signal au cours du développement de la maladie. Le nombre d'animaux est faible du fait aussi de la non-invasivité de l'IRM tout en obtenant des statistiques fiables. Une analgésie sera utilisée dès le début de l'expérimentation et sera poursuivie tout au long des 12 semaines d'observations IRM. Les 6 rats seront répartis dans deux cages avec des tubes en carton, de la paille, du coton, un bois à ronger, de la nourriture et de l'eau à volonté. Des observations quotidiennes et des scorages hebdomadaires d'évaluation de la douleur seront pratiqués dès le début de l'expérimentation pour évaluer l'évolution de la maladie. De ce fait, des points limites et des critères d'arrêt ont pu être établis. La cellule bien-être du laboratoire sera impliquée quotidiennement dans l'évolution du protocole.

12823 La recherche translationnelle dans les syndromes de vieillissement prématuré causés par des mutations dans le gène LMNA ou les gènes associés fait l'objet de nos travaux de recherche. Nous travaillons plus particulièrement sur le syndrome de vieillissement prématuré dit « Progeria typique » ou Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS) dû à une mutation hétérozygote dans le gène LMNA (pG608G au niveau protéique). Cette pathologie se caractérise par un retard de croissance, une ostéolyse, une lipodystrophie et une athérosclérose sévère et disséminée. Les patients décèdent à l'âge moyen de 13,5 ans, suite à un infarctus du myocarde dans la plupart des cas. Nous avons développé un modèle murin reproduisant parfaitement la mutation génétique et le phénotype de la Progeria afin d'obtenir des preuves précliniques d'efficacité thérapeutique.

Nos travaux ont pour but de développer des preuves de concept thérapeutiques précliniques permettant de passer à une phase d'essai clinique chez les patients.

Ce nouveau projet a pour but l'évaluation de l'efficacité de différentes approches thérapeutiques (thérapie génique, pharmacologique, restriction calorique) sur la fonction cardiaque. Pour cela, 1026 souris seront analysées par échocardiographie. Cet examen d'imagerie non invasive permet de mesurer différents paramètres cardiaques tels que la fraction de raccourcissement, le flux aortique, le flux mitral, les volumes diastolique et systolique d'éjection. Bien que ce soit un processus indolore, l'échographie se fait sous anesthésie générale afin de s'assurer de l'immobilité de la souris.

Lors de notre étude, nous appliquerons une démarche éthique et respecterons la règle des 3R :

Remplacer : Notre modèle animal est unique et est le seul à reproduire fidèlement la maladie humaine, il est donc irremplaçable pour réaliser les essais précliniques que nous voulons mener.

Réduire : Nous utiliserons des tests statistiques afin de définir le nombre minimum d'animaux à étudier pour mettre en évidence un bénéfice thérapeutique,

Raffiner : Les animaux seront suivis quotidiennement. L'apparition de signes d'inconfort ou de souffrance (perte d'appétit, prostration, plaies...) nous conduira à choisir l'action appropriée à mener en fonction d'une grille de score de douleur qui a été mise en place. Durant la durée du projet, afin de respecter leur instinct grégaire, les souris seront hébergées par petit groupe dans des cages dont l'environnement sera enrichi à l'aide de maisonnettes en carton ou de kraft. L'animal ne sera isolé que si le protocole l'exige ; dans ce cas son environnement sera enrichi par une maisonnette en carton et du kraft. Les souris utilisées seront hébergées dans un établissement utilisateur agréé et manipulées par du personnel compétent.

12824 En Europe comme aux Etats-Unis, le cancer est actuellement la seconde cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires. En France, cette pathologie provoque environ 33 % des décès chez les hommes et 23 % chez les femmes. Il est donc primordial de s'intéresser à cette maladie et de trouver de nouvelles thérapies. Les cellules cancéreuses, initialement des cellules normales, ont acquis au cours du temps un certain nombre de caractéristiques faisant qu'elles ne répondent plus au système de régulation de l'organisme et prolifèrent indéfiniment pour former une tumeur maligne et/ou des métastases. Un enjeu majeur pour la recherche consiste donc à trouver de nouvelles

thérapies ciblant spécifiquement ces cellules cancéreuses tout en limitant les effets secondaires sur l'organisme.

L'efficacité d'un médicament résulte de l'activité de la molécule sur sa cible thérapeutique. Il faut donc s'assurer en amont qu'elle parvienne bien jusqu'à sa cible et vérifier qu'elle soit correctement absorbée, distribuée, métabolisée et éliminée par l'organisme. L'étude de ces propriétés constitue la pharmacocinétique.

Le but de la pharmacocinétique est de fournir les informations nécessaires à la sélection des médicaments et à adapter la posologie du médicament en obtenant des concentrations conduisant à une efficacité optimale du principe actif avec un minimum de risques en terme d'effets secondaires. Il est donc nécessaire d'étudier la « répartition » de la molécule dans le corps en amont des études d'efficacité.

Ces dernières années, les pharmacocinéticiens ont mis en place de nombreux tests in vitro visant à remplacer l'usage de l'animal. La majorité des études de pharmacocinétique est menée sur des récepteurs, enzymes, fractions cellulaires isolées, cellules isolées ou organes isolés. Cependant, même si l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'excrétion d'une molécule dans l'organisme peuvent être estimées au moyen de tests in vitro, elles ne peuvent pas être complètement et infailliblement prédites. Il est donc nécessaire d'avoir recours à l'animal pour discriminer de façon certaine les produits les plus avancés.

En complément de ces études de pharmacocinétique, il est également nécessaire pour certains composés candidats d'évaluer leur impact sur l'intégrité des cellules sanguines et les biomarqueurs associés. En effet, certains produits peuvent provoquer une modification des paramètres sanguins (nombre de globules blancs, de globules rouges ou de plaquettes dans le sang périphérique) qui peuvent être utilisés comme marqueurs d'activité pharmacologique. Ce type d'études pharmacocinétiques et/ou hématologiques se fait en amont des études d'efficacité, notamment afin de discriminer plusieurs candidats médicament et poursuivre ultérieurement l'analyse de l'activité anti-tumorale uniquement pour les candidats les plus intéressants. Les propriétés physico-chimiques des molécules et les résultats des tests in vitro servent donc de base pour rationaliser les études in vivo de pharmacocinétique afin d'obtenir le maximum d'information. De plus, ces études restent limitées aux candidats très avancés dans la phase de recherche afin de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Pour réaliser ces études, des souris saines sont traitées par voie orale, intraveineuse ou intrapéritonéale, avec différents candidats médicaments à des doses non toxiques pour l'animal puisqu'elles ont été contrôlées en amont dans des études dédiées, faisant l'objet d'un autre projet. Des prélèvements de sang répétés en cinétique sont ensuite réalisés à différents temps afin de mesurer les paramètres hématologiques et/ou le taux plasmatique du médicament. Les prélèvements de sang sont effectués selon la technique du « microsampling », méthode systématiquement privilégiée par rapport aux autres techniques usuelles car extrêmement rapide, réalisable plusieurs fois sur un même individu, et respectant les volémies et les conditions physiologiques de la souris. En effet, elle permet de prélever de très faible quantité de sang de manière répétée. Cette technique a donc permis de réduire considérablement le nombre d'animaux inclus par étude et d'utiliser l'animal dans des conditions expérimentales adaptées.

Afin que les souris se trouvent dans les meilleures conditions, elles sont hébergées dans une animalerie adaptée et contrôlée, par groupes sociaux, et en présence d'éléments d'enrichissement comme du coton pour favoriser leur instinct de nidification. Les expérimentateurs veillent à i) évaluer toute altération éventuelle de l'état général de l'animal en s'appuyant sur une liste de points limites prédéfinie, ii) mettre en place les mesures nécessaires afin d'éviter toute souffrance de l'animal, ceci afin de répondre à la règle des 3R (Replacer, Réduire, Raffiner). Compte tenu du nombre de produits pouvant être étudiés sur 5 ans, on estime utiliser 540 souris au maximum sur toute la durée du projet.

12825 Le glaucome est une maladie dégénérative du nerf optique, c'est la deuxième cause de cécité dans le monde. Le plus souvent, il est associé à une pression intra oculaire élevée, mais est aussi présent

chez des patients qui ont une pression normale. Il est caractérisé par une dégénérescence d'un type particulier des cellules de la rétine : les cellules ganglionnaires rétinienne (RGC). Ces cellules jouent un rôle essentiel dans la transmission du signal visuel de la rétine au cerveau.

L'objectif de ce projet est de développer un modèle de glaucome chez le rongeur et le lapin. Nous souhaitons utiliser des modèles expérimentaux qui ciblent l'atteinte des RGC. La stratégie consiste à réaliser des injections intra vitréennes de substances susceptibles d'entraîner la mort des RGC (Endothéline1, NMDA...) et à suivre la survie des RGC après administration de traitements potentiellement neuroprotecteurs.

Ce projet nécessitera au maximum sur 5 ans 2280 rats, 2280 souris, 2280 lapins adultes.

Afin de respecter la règle des 3R :

Remplacer : à ce jour, aucune méthode alternative ne permet de mimer l'œil dans son environnement et dans sa globalité fonctionnelle. En effet, l'œil est composé de différents tissus de physiologies différentes soumis aux variations environnementales, aux interactions des tissus et organes voisins. Le projet nécessitera donc d'avoir recours à des animaux compte tenu des particularités de l'organe concerné par le projet et l'absence de méthode alternative.

Réduire : le nombre d'animaux par groupe est limité pour cependant rester adapté à l'analyse des résultats par tests statistiques afin de permettre de conclure sur l'efficacité ou non d'un traitement. Des évaluations non invasives de la pathologie sont utilisées tout au long de l'étude pour éviter la mise à mort l'animal.

Raffiner : un suivi quotidien des animaux sera effectué afin minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettent de limiter une éventuelle douleur à son minimum. Les animaux sont hébergés dans des cages contenant un enrichissement adapté à l'espèce pour améliorer le bien-être de l'animal. Les examens non invasifs pour évaluer la pathologie sont semblables à ceux pratiqués chez l'homme en cabinet ophtalmologique ou en cabinet vétérinaire. Les examens de l'œil qui requièrent un immobilisme de l'animal pourront être réalisés sous anesthésie pour son confort. Ce projet est soumis pour évaluation à un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

12826 Lors de la réplication, les virus à ARN génèrent des erreurs, des mutations. La réplication de l'ARN viral se fait avec des taux de mutation élevés ce qui crée un « nuage » de variants, présentant certaines mutations potentiellement bénéfiques, et qui permettent aux populations virales une plus grande probabilité d'évolution et d'adaptation à de nouveaux environnements ou défis lors de l'infection. Il a été précédemment démontré que l'étude de l'infection et de l'évolution virale naturelle chez la souris permet d'identifier les mutations virales permettant au virus d'élargir son tropisme, c'est-à-dire, d'infecter de nouvelles espèces de moustiques. Ainsi, les chercheurs ont pu identifier les mutations qui étaient à l'origine de l'épidémie du virus de chikungunya en 2005/2006, après seulement deux semaines d'étude. Ces études démontrent que l'évolution naturelle en laboratoire pourrait nous placer en amont des prochaines épidémies, en améliorant la surveillance et la recherche de nouveaux composants antiviraux contre les souches virales à venir. Actuellement, nous travaillons sur le virus de Mayaro, un virus apparenté au virus de chikungunya, qui circule entre moustiques et primates dans la région de l'Amazonie. Bien que ce virus n'ait pas encore déclenché une épidémie chez l'homme, des infections chez l'homme sont observées depuis plusieurs années. Il est donc nécessaire de mieux étudier ce virus, et son évolution chez les moustiques urbains et chez le mammifère, avant que celui-ci déclenche un véritable cycle urbain. Le but de ce projet est de déterminer quelles mutations permettraient à ce virus de se propager chez les moustiques urbains et entre les moustiques et les mammifères, pour ensuite trouver des approches antivirales qui pourront empêcher cette transmission.

Le recours à l'animal est nécessaire car l'évolution virale en culture cellulaire ne reproduit pas totalement ce qui se passe au sein d'un hôte infecté et la confirmation d'atténuation virale nécessite un modèle animal. Néanmoins, nous allons d'abord suivre l'évolution virale en culture cellulaire en utilisant plusieurs types cellulaires pour mieux comprendre son potentiel évolutif.

Ce projet comprend deux procédures de sévérité modérée. Dans la première, nous allons réaliser une série de transmissions naturelles d'infection à partir d'un moustique infecté vers la souris, et puis de la souris infectée vers d'autres moustiques. Pour ce faire, des moustiques sont infectés avec le virus Mayaro sauvage pendant 10 jours, afin de permettre au virus d'évoluer de façon naturelle chez le moustique. Ensuite, la transmission naturelle du virus sera réalisée entre les moustiques infectés et des souris naïves, par piqure de moustique. Une deuxième transmission naturelle sera ensuite réalisée entre ces souris infectées et un nouveau groupe de moustiques non-infectés. Le but de cette série de transmissions est de recréer dans le laboratoire le cycle de transmission naturelle entre insecte et mammifère qui constitue le cycle de vie des arbovirus (tel que le virus Mayaro). Les populations virales prélevées des moustiques et des souris infectées seront analysées génétiquement pour identifier si des nouvelles mutations virales apparaissent qui permettraient au virus de Mayaro d'améliorer sa capacité de transmission. Si lors de la première procédure, nous identifions de nouvelles mutations présentant des caractéristiques différentes par rapport au virus sauvage en culture cellulaire, nous reviendrons chez la souris pour étudier le virus évolué (portant les nouvelles mutations) afin de déterminer s'il présente un phénotype différent (c'est-à-dire, une capacité à se multiplier différente par rapport au virus sauvage). Si c'est le cas, ce nouveau virus nous permettra de revenir sur des expériences *in vitro* visant à développer des approches antivirales qui pourraient mieux cibler les nouvelles mutations et empêcher que ce genre de mutant puisse évoluer et émerger dans la nature. Un maximum de 1200 souris sera nécessaire sur une durée de 5 ans (ce nombre minimum nécessaire a été validé par un statisticien). Les souris bénéficieront d'enrichissement de l'environnement (maisonnettes). La douleur subie au moment de la manipulation sera de très courte durée car nos expériences sont constituées d'infection par injections sous-cutanées rapides ou par piqure de moustique. Les souris seront suivies quotidiennement et seront mises à mort 4 jours après l'infection avant le développement clinique de la pathologie, pour récupérer différents tissus et y quantifier les virus. Il n'est pas nécessaire d'attendre que l'infection aboutisse à des signes de souffrance, à la morbidité et à la mort (après 6 jours chez les nouveau-nés), car la charge virale maximale est atteinte entre 3 et 4 jours après infection, et suffira pour déterminer le phénotype d'un variant viral par rapport au virus sauvage.

12827 *Clostridium difficile*, bactérie Gram + anaérobie et sporulée, appartient au microbiote intestinal humain et représente la première cause de diarrhées infectieuses nosocomiales de l'adulte au décours d'un traitement antibiotique. Les études menées à ce jour sur le pouvoir pathogène de cette bactérie extracellulaire ont été réalisées, pour la majorité d'entre elles, *in vitro* et concernent tant des facteurs de virulence déjà identifiés chez d'autres organismes proches de *C. difficile* (toxines, protéines de surfaces, etc...) que des facteurs inconnus susceptibles d'intervenir dans le processus d'infection et en particulier lors de la colonisation bactérienne (adhésion, fitness, facteurs de régulation, ...). Pour ces derniers, leur rôle ne peut être que partiellement étudié *in vitro* dans la mesure où l'environnement intestinal est difficilement reproductible dans les conditions de culture utilisées en laboratoire. L'objectif scientifique de ce projet sera d'étudier *in vivo* l'importance de fonctions bactériennes et de ses régulateurs qui interviennent dans l'adaptation et la colonisation de *C. difficile* dans le tractus intestinal. Les gènes codant ces fonctions et/ou les régulateurs qui les contrôlent auront fait l'objet d'une étude préalable *in vitro* que nous souhaitons confirmer dans l'un ou l'autre des modèles que nous aurons à utiliser.

Le pouvoir pathogène de *C. difficile* repose principalement sur la capacité de ces souches à produire deux toxines (TcdA et TcdB). Cependant, la première étape du processus de pathogenèse de *C. difficile* est la colonisation du tractus intestinal. Le but du présent projet est d'étudier *in vivo* le rôle d'un certain nombre des fonctions bactériennes identifiées *in vitro* comme intervenant lors de la colonisation de *C. difficile*, tant chez la souris axénique, c'est à dire dépourvue de germes, que la souris conventionnelle dont la flore aura été perturbée par un traitement antibiotique, i.e., souris dysbiotique. Le projet a été construit dans le respect de la règle des 3R. Etant donné que ce projet est une validation *in vivo* de résultats obtenus *in vitro*, il n'y a pas de méthodes alternatives à l'utilisation d'un modèle murin *in vivo* que nous ne pouvons remplacer. Les infections à *C. difficile* surviennent presque exclusivement lorsque la flore intestinale qui exerce un effet de barrière vis à vis de ce pathogène est modifiée par un traitement antibiotique. Des souris adultes C3H axéniques

ou conventionnelles (qui seront traitées par un cocktail d'antibiotiques 6 jours auparavant) recevront par gavage intra-gastrique une dose de bactéries de la souche sauvage ou de la souche mutante d'intérêt affectée dans une étape importante de la colonisation. Ce projet comportera deux procédures expérimentales de niveau de sévérité « légère » car les souris ne sont pas sensibles aux infections à *C. difficile*. Il apparaît parfois une légère diarrhée après 2 jours d'infection mais les souris se rétablissent le jour d'après et une clairance totale de *C. difficile* s'observe 12 à 15 jours après infection. Pour raffiner l'expérimentation, afin d'éviter toute déshydratation, nous utiliserons du diet-gel ou une injection de sérum physiologique si nécessaire. Cependant des résultats obtenus lors d'une étude pilote, n'ont montrés aucune déshydratation lors d'une infection par *C. difficile*. Dans l'éventualité où des animaux seraient durablement malades, ils seront mis à mort pour éviter toute souffrance. Par ailleurs, il est à noter que le gavage est un acte reflexe qui est sans douleur pour la souris et sera pratiqué par des personnes expérimentées. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, nous nous sommes basés sur nos expériences précédentes qui nous indiquent que chaque expérience nécessitera, par souche testée, 24 animaux : 12 souris infectées par la souche mutante et 12 souris infectées par la souche de type sauvage, ce qui est le nombre requis pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Nous pensons tester 10 à 15 mutants d'intérêt sur la période du projet. Un nombre inférieur d'animaux pourrait conduire à une expérience non interprétable en cas de décès accidentel d'un individu au cours de l'expérience. La colonisation de la souche sauvage ou des mutants sera suivie en dénombrant les bactéries dans les fèces récupérées et dans le caecum à 2, 7 et 15 jours (n = 4/point expérimental). Les animaux ne seront jamais privés de nourriture ni de boisson. Au maximum 384 souris seront utilisées dans ce projet. Pendant la durée de l'expérience, elles resteront dans leur environnement habituel.

L'identification in vivo de nouveaux facteurs participant au processus infectieux de *C. difficile* est important tant fondamentalement (car le pouvoir pathogène de cette bactérie est multifactoriel et ne repose pas uniquement sur la production des toxines) que pour la mise en place de stratégies limitant la colonisation de cet organisme dans le tractus intestinal, une étape essentielle de l'infection.

12828 L'insuffisance rénale chronique est une maladie grave qui entraîne une détérioration graduelle et irréversible de la capacité des reins à filtrer le sang et à excréter certaines hormones. Les produits du métabolisme et l'eau en excès passent de moins en moins dans l'urine et s'accumulent dans l'organisme. L'insuffisance rénale chronique résulte des complications du diabète, de l'hypertension ou d'autres maladies. L'insuffisance rénale aiguë, quant à elle, survient soudainement. Elle se produit souvent à la suite d'une diminution réversible du flot sanguin rénal. Les causes sont multiples, comme la déshydratation, les infections sévères, une obstruction comme dans l'hypertrophie de la prostate, ou l'exposition à des substances qui sont toxiques pour les reins comme les produits de contraste utilisés en radiologie. Un taux trop élevé d'acide urique est également un symptôme d'insuffisance rénale.

L'exploration fonctionnelle rénale repose sur l'interprétation de variables biologiques urinaires et plasmatiques, qui sont des marqueurs indirects de la fonction rénale. Sa mise en œuvre doit reposer sur l'identification de signes cliniques, peu spécifiques, ou de facteurs de risques. L'analyse d'urine est essentielle en néphrologie clinique, mais elle ne permet pas la quantification de la perte fonctionnelle rénale. Les fluctuations physiologiques de la composition urinaire nécessitent de répéter l'analyse d'urine pour confirmer une anomalie. La mesure de la densité urinaire est un examen complémentaire utile, mais ses fluctuations physiologiques sont importantes. La protéinurie n'est pas un marqueur fonctionnel, mais un marqueur pronostique et un facteur physiopathologique. Une insuffisance rénale peut être présente sans protéinurie et inversement. La créatininémie est un marqueur indirect, mais tardif, de la perte fonctionnelle rénale. Des mesures répétées de la concentration basale dans des conditions standardisées peuvent cependant permettre de détecter plus précocement une altération de la fonction rénale.

Le but de ce projet est de tester des médicaments déjà connus ainsi que de nouvelles molécules sur la fonction rénale chez le rat et la souris. Pour cela, les animaux seront placés dans des cages

métaboliques pendant 24 heures. Ces cages sont conçues de façon à laisser passer les urines en bloquant totalement les fèces. Cela nous permettra de tester l'effet des candidats médicaments sur le volume et la composition des urines pendant la phase active (la nuit) et la phase de repos (le jour). Ce système non-invasif de test de la fonction rénale représente un gros avantage par rapport aux protocoles expérimentaux utilisés couramment. Notre protocole expérimental respecte le principe des 3R,

Remplacer : les tests in vitro n'étant pas probants, l'utilisation des animaux de laboratoire est indispensable pour valider cette étude.

Réduire : le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé en mesures répétées, le nombre d'animaux est réduit à 12 animaux par groupe, et le nombre de groupes sera en fonction du nombre de molécules à tester. Ce projet nécessite l'utilisation de 960 rats et 960 souris sur 5 ans.

Raffiner : nous utiliserons un modèle non-invasif, qui réduit fortement la souffrance animale. Tous les efforts possibles seront mis en place afin de minimiser la douleur, l'angoisse et la souffrance animale. Le suivi quotidien des animaux permettra d'identifier tout signe de douleur ou de souffrance nécessitant une intervention la plus précoce possible. L'examen des animaux permettra d'évaluer plusieurs paramètres de santé et bien-être, notamment le changement de couleur et d'aspect des poils, diminution de la prise de boisson et de nourriture, diminution de l'activité exploratoire dans la cage et perte de poids. Si la perte de poids sera supérieure à 15% du poids corporel initial, l'animal sera euthanasié.

Dans le cas où un prélèvement de sang sera nécessaire, les animaux seront manipulés sous anesthésie générale afin de minimiser le stress et la douleur.

Les animaux seront pesés 2 fois par semaine. La manipulation des animaux et le gavage seront effectués exclusivement par du personnel ayant la formation nécessaire. Un enrichissement du milieu dans les cages sera mis en place. Lors des expériences dans les cages métaboliques, afin de réduire le stress lié à l'isolement nécessaire, les animaux resteront en contact visuel et olfactif.

12829 Les lymphocytes B sont essentiels pour protéger notre organisme contre les maladies. Ils ont une double fonction. Ils peuvent reconnaître et présenter des antigènes à d'autres cellules immunitaires et ils peuvent produire de grandes quantités d'anticorps pour lutter contre les agents pathogènes. Les lymphocytes B se développent dans la moelle osseuse et se différencient en cellules productrices d'anticorps et en cellules B mémoire dans des organes immunitaires secondaires où elles forment les centres germinatifs (GCs). Les GCs sont une caractéristique essentielle de l'immunité adaptative. Ils sont responsables d'une vaccination efficace afin de permettre la diversification de la production d'anticorps et de la génération d'une mémoire immunitaire qui a lieu dans les GCs. La compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui contrôlent la réponse des lymphocytes B est essentielle pour développer de nouveaux vaccins plus efficaces qui nous protègent contre les agents pathogènes et les virus. Ce projet examinera comment les protéines liant l'ARN modèle contrôlent les réponses immunitaires et la production des anticorps.

Dans ce projet, nous nous limiterons aux seules expériences considérées comme absolument indispensables, et ce dans le respect de la règle des 3Rs.

Remplacer : Le modèle souris est requis afin de mimer les interactions complexes entre les différentes cellules immunitaires qui de ce fait, ne peuvent pas être remplacées par une méthode alternative comme l'utilisation des lignées cellulaires.

Réduire : Le nombre de souris utilisées est optimisé grâce à l'utilisation d'outils statistiques. Afin de conduire ce projet, le nombre de souris nécessaire est estimé au plus à 1674 souris/an (8370 souris pour 5 ans).

Raffiner : Les manipulateurs ont reçu une formation spécifique certifiée nationale et/ou européenne et s'inscriront régulièrement à de nouveaux cours de formation pour affiner l'utilisation d'animaux à des fins d'expérimentation. Des protocoles standardisés et affinés concernant l'hébergement, l'élevage et l'expérimentation sont utilisés. Les souris sont maintenues en groupe sociaux avec accès ad libitum à la nourriture, à l'eau, en milieu enrichi (matériel de nidification, abris). L'état des animaux est contrôlé tous les jours par un technicien qualifié. La vaccination avec des modèles

d'antigènes ne provoque pas d'autre douleur que celle de l'injection. L'anesthésie et l'analgésie sont utilisées dans les procédures dans lesquelles douleur et stress sont supérieurs à ceux provoqués par l'utilisation d'une aiguille de 25G. Si nous notons des comportements inhabituels de l'animal (prostration, amaigrissement, perte de plus de 20% de son poids initial) qui peuvent être attribués à des douleurs relatives aux procédures, les animaux seront euthanasiés.

12830 Une grande partie des maladies émergentes ou réémergentes sont des zoonoses, c'est-à-dire qu'elles se transmettent naturellement de l'homme à l'animal ou inversement. Beaucoup de ces zoonoses sont transmises par l'intermédiaire d'insectes hématophages (qui se nourrissent de sang) au cours de leur piqûre. Certains pathogènes vectorisés par les tiques, comme les rickettsies, sont à l'origine de pathologies potentiellement fatales, comme c'est le cas des rickettsioses à *Rickettsia rickettsii* en Amérique du Nord. Les parasites du genre *Leishmania*, transmis généralement par les phlébotomes, sont quant à eux parfois responsables d'épidémies très meurtrières en Amérique du Sud. Ces deux types de pathogènes ont souvent été associés aux tiques mais jusqu'à aujourd'hui, leurs relations avec cet arthropode sont toujours peu comprises. L'étude de cet arthropode et de ses relations avec les pathogènes qu'il héberge et peut transmettre est un axe de recherche important pour la surveillance et la lutte contre les maladies vectorielles. Cependant, le maintien d'arthropodes en laboratoire nécessite de pouvoir leur fournir des repas sanguins adaptés aux besoins de leur espèce, or les tiques sont des arthropodes qui prennent des repas très longs sur leur hôte, jusqu'à plusieurs semaines. Des méthodes alternatives ont été développées pour nourrir les arthropodes via des systèmes de membranes artificielles mais aucune méthode n'a été prouvée réellement efficace pour le maintien à long terme de colonies de tiques, notamment en raison de la longue durée de leur repas qui conduit à une coagulation du sang dans l'appareil. Nous souhaitons mettre au point, dans un premier temps, un modèle de gorgement de tiques sur hamster syrien car c'est un modèle pertinent pour un bon nombre de pathogènes transmis par les tiques d'intérêt majeur en santé humaine, comme les rickettsies et les leishmanies. Ensuite, nous prévoyons d'étudier les relations entre les tiques et ces microorganismes via des modèles expérimentaux d'infection. Des hamsters d'élevage destinés à la recherche animale, seront hébergés en cage individuelle car ce sont des animaux solitaires et territoriaux, cependant, chaque animal possédera une roue et d'autres éléments d'enrichissement tels que des tunnels et un dôme par cage. Ils seront surveillés quotidiennement par des personnels qualifiés pour évaluer leur bien-être. Des points limites spécifiques et des critères d'arrêt ont été définis. Nous prévoyons d'utiliser 500 animaux pour 5 ans. Cet effectif dépend principalement du nombre de modèles expérimentaux qui seront effectués pendant la période couverte par cette demande. Nous anticipons dans cette demande la possibilité de devoir refaire certaines expérimentations, en revanche, si les objectifs sont atteints avec moins d'animaux, il est possible que moins de 500 animaux soient utilisés en réalité. Dans ces divers modèles, des rickettsies et leishmanies de classe 2 et 3 (hors MOT) seront utilisées pour infecter des animaux en animalerie A3.

12831 La fibrose pulmonaire idiopathique est une maladie chronique, dévastatrice et mortelle, caractérisée par la dégradation progressive des fonctions pulmonaires. Le terme « fibrose pulmonaire » fait référence à un processus de cicatrisation aberrante du tissu pulmonaire conduisant à une réduction de l'élasticité et une destruction des alvéoles pulmonaires provoquant une dyspnée (difficulté à respirer) qui s'aggrave avec le temps. Cette pathologie serait la conséquence d'agressions répétées de la surface des alvéoles pulmonaires (tabac, infections virales, pollution), probablement associées à un dérèglement de la réponse immunitaire qui favoriserait ce processus de cicatrisation excessive. Les poumons malades sont infiltrés par une population de cellules du système immunitaire, les lymphocytes, dont la contribution à l'apparition et/ou le développement de la maladie n'est pas connue.

Les lymphocytes MAIT (Mucosal Associated Invariant T cells) constituent une population de lymphocytes T circulant dans le sang et pénétrant dans les muqueuses, le foie, l'intestin et les poumons et participant à l'immunité anti-infectieuse. Les MAIT reconnaissent spécifiquement certains types de microbes. A leur contact, ils s'activent, produisent des substances qui aident le

système immunitaire à détruire les bactéries et induisent une inflammation. Cependant, même en l'absence d'infection, les MAIT peuvent s'activer « spontanément » dès qu'ils pénètrent dans un tissu inflammatoire où ils vont amplifier ce phénomène d'inflammation, ce qui peut être délétère. Ainsi, il a été décrit que les MAIT pourraient être impliqués dans le développement de certaines maladies inflammatoires, de maladies auto-immunes et de maladies fibrosantes comme la cirrhose hépatique.

Comparé à des sujets contrôles, le nombre de MAIT circulant dans le sang est diminué chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique, plus particulièrement dans les formes sévères de la maladie. De plus, les MAIT circulants semblent être plus activés dans les formes sévères de fibrose. Ces résultats préliminaires nous amènent à penser que les MAIT sont moins nombreux dans le sang car ils pourraient être recrutés et activés dans les poumons chez les patients présentant une forme sévère de fibrose pulmonaire idiopathique. La question serait alors de savoir si les MAIT favorisent le développement de la maladie. A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour modéliser le développement de la fibrose pulmonaire.

L'objectif de ce projet est d'étudier ces hypothèses in vivo dans un modèle animal se rapprochant le plus possible de la pathologie des patients. Le modèle souris est pertinent car son système respiratoire est très similaire à celui de l'Homme. L'exposition pulmonaire à un agent anti-cancéreux est un modèle établi de fibrose pulmonaire chez la souris. De plus, les souris offrent la possibilité de travailler sur des organismes génétiquement modifiés et de cibler le rôle des MAIT en particulier sur le développement de la fibrose pulmonaire. Nous utiliserons trois modèles de souris qui diffèrent par leur fréquence de MAIT : forte (comme chez l'homme), faible ou nulle. Ces lignées ne présentent pas de phénotype (y compris pulmonaire) particulier. Ce sont des modèles bien établis qui ont permis d'étudier la biologie fondamentale des cellules MAIT, ainsi que leur implication dans de nombreux modèles de maladies inflammatoires et auto-immunes. Nous souhaitons ici déterminer si l'absence de MAIT permet de freiner le développement de la fibrose pulmonaire.

Nous testerons notre hypothèse en instillant cet agent anti-cancéreux dans la trachée par voie chirurgicale chez des souris préalablement anesthésiées. Les souris seront euthanasiées à J14 après anesthésie profonde et différents prélèvements seront réalisés afin de mesurer le degré de fibrose et d'inflammation pulmonaire. Pour récupérer les cellules immunitaires présentes au niveau des alvéoles pulmonaires, une solution physiologique sera injectée dans les bronches puis aspirée et analysée. Le bloc cœur poumon sera prélevé en vue d'analyser la morphologie pulmonaire, de quantifier les MAIT et de quantifier l'expression de marqueurs de fibrose et d'inflammation. Un prélèvement de sang sera également réalisé pour quantifier et mesurer l'état d'activation des MAIT.

Nous avons réduit le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre hypothèse de travail. Après analyse statistique le nombre de souris nécessaires pour mener à bien cette expérience est de 48 animaux (16 animaux dans chacun des trois groupes : 8 recevant l'agent anti-cancéreux et 8 recevant une solution saline contrôle). Suite à l'instillation par voie chirurgicale, une source de chaleur sera mise en place pour éviter l'hypothermie. L'administration de l'agent anti-cancéreux peut entraîner une perte de poids dans les 7 premiers jours. Une attention particulière sera donc portée au bien-être des animaux par une surveillance journalière assurée par le personnel de l'animalerie et les expérimentateurs. Nous veillerons à réduire au minimum l'intensité et la durée des souffrances ressenties par les animaux en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte le poids et le comportement des animaux. Les souris présentant des souffrances ou des douleurs (atteinte du point limite) seront euthanasiées selon la méthode réglementaire. A l'issue des 14 jours d'expérimentation tous les animaux seront euthanasiés. La durée totale du projet, incluant le temps d'élevage nécessaire à l'obtention du nombre suffisant de souris sera de 1 an.

12832 L'effet de l'exposition à des pesticides est une préoccupation sociétale majeure. Une des cibles privilégiées de telles substances est le fœtus exposé à travers la contamination de sa mère. Ce projet s'intéresse plus particulièrement aux effets d'un mélange de pesticides retrouvés sur les fruits, sur la fonction thyroïdienne materno-fœtale et à leurs conséquences sur le développement du

système nerveux central. Cette étude sera réalisée sur un modèle ovin pertinent par rapport à l'humain en termes de physiologies thyroïdienne et fœtale.

L'objectif de cette étude préliminaire est d'évaluer les doses de pesticides à utiliser sur le modèle de la brebis gravide pour reproduire l'exposition humaine fœtale à ces pesticides. Les interactions mères fœtus sont extrêmement complexes et à ce jour aucune méthode alternative ne permet de les appréhender de façon correcte. Nous avons précédemment développé le modèle du fœtus ovin instrumenté, qui permet de prendre en compte l'ensemble des facteurs physiologiques (transfert placentaire, métabolisme maternel et fœtal...) impliqués dans l'exposition fœtale aux pesticides. Ce modèle animal consiste en un fœtus ovin au dernier tiers de gestation dont les vaisseaux sanguins sont cathétérisés au cours d'une intervention chirurgicale. L'intérêt de ce modèle est qu'il autorise la réalisation de prélèvements sanguins répétés du côté fœtal et du côté maternel sur une période de plusieurs semaines, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux dans le respect des 3Rs et d'accroître la précision des mesures alors qu'un modèle classique rongeurs ne peut être prélevé qu'une seule fois.

Respect de la règle des 3R.

Remplacer : La réalisation d'administrations et de prélèvements sanguins du côté maternel et fœtal dans un modèle intégré qui prend en compte l'ensemble des facteurs qui déterminent l'exposition interne fœtale aux pesticides, ne peut être fait avec des approches « in vitro » permettant de ne pas utiliser d'animaux vivants.

Réduire : Le nombre d'individus (10) correspond au nombre minimum qui permet d'assurer la reproductibilité des mesures et la robustesse des paramètres estimés.

Raffiner : Afin de respecter le bien-être animal, les animaux, placés dans un box individuel après la chirurgie, ont un contact visuel avec leurs congénères de façon à limiter l'impact de leur isolement. Concernant la gestion de la douleur, une prémédication est réalisée avant la chirurgie afin de limiter la douleur, le stress et le risque d'infection. Un protocole d'anesthésie générale et de gestion de la douleur adapté est appliqué lors de la chirurgie et les constantes physiologiques sont suivies à l'aide d'un appareillage de monitoring cardio-respiratoire. Un examen clinique quotidien est réalisé après la chirurgie par un vétérinaire référent et en cas de diminution de l'appétit et/ou de modification du comportement (diminution de la rumination), des traitements antalgiques adaptés sont utilisés.

12833 La chirurgie bariatrique (dite métabolique) a démontré les bénéfices métaboliques du court-circuit gastrique entraînant une perte de poids significative des patients obèses et surtout une rémission spectaculaire (80 % des cas) du déséquilibre glycémique des patients atteints de diabète de type II. La mise en place, depuis ces dernières décennies, d'un modèle expérimental de chirurgie bariatrique chez le mini-porc a permis d'élucider certains mécanismes moléculaires, notamment ceux visant l'amélioration de l'équilibre glycémique après la chirurgie bariatrique de type Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB). L'utilisation du modèle animal mini-porc constitue ainsi une avancée majeure dans la compréhension des effets physiologiques responsables de la guérison du diabète, mais aussi dans la recherche de nouvelles procédures chirurgicales peu invasives. La chirurgie digestive endoscopique par voie naturelle (NOTES, pour Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery) est une nouvelle procédure moins invasive mais qui nécessite à la fois une grande rigueur technique et un certain nombre de développements technologiques spécifiques. C'est dans cette perspective d'innovation de la technique opératoire de la chirurgie bariatrique, qu'une nouvelle stratégie opératoire permettant de réaliser un mini court-circuit du système digestif, reliant physiquement l'estomac à l'intestin, sans réduction gastrique, est en cours de mise au point ; cette anastomose gastro-intestinale (AGI) permettrait, notamment de réduire les complications et les risques post-opératoires. Certaines études ont ainsi décrit la faisabilité de l'AGI par la procédure NOTES en utilisant un Dispositif Médical (DM) capable de réaliser une anastomose étanche entre la muqueuse gastrique et la paroi intestinale. Cependant, l'évaluation de l'efficacité de l'AGI par voie endoscopique (AGIE), ainsi que des éventuels bénéfices métaboliques, reste à être démontré avant de proposer son application en clinique. Le rationnel de ce DM est donc de proposer une alternative au bypass duodéno-jéjunal chirurgical et en proposant au bol alimentaire, un circuit gastro-intestinal additif à celui du pylore. Ainsi, au-delà des effets métaboliques probables que peut

provoquer ce type d'intervention chez les patients obèses diabétiques, une application clinique directe est celle de la gastro parésie.

La première étude réalisée sur des porcs charcutiers, a permis de démontrer la faisabilité de la réalisation d'une AGI par voie endoscopique, et donc peu invasive, en utilisant un dispositif médical (DM) introduit par chirurgie endoscopique. Cette procédure permet de rapprocher et de maintenir les parois digestives du lumen intestinal à l'estomac apposés et créant ainsi une AGI. Le DM, de la famille des stents, est constitué de Nitinol® composé d'un alliage de nickel et de titane (ratio 1 :1) à mémoire de formes lui conférant des caractéristiques physiques innovantes. Il est introduit par voie endoscopique chez les porcs sous anesthésie générale après 48h de diète hydrique, et implantée entre l'estomac et l'intestin. Deux pistes seront explorées : un développement à visée thérapeutique pour l'indication gastro parésie et un autre explorant les répercussions métaboliques post AGIE. L'efficacité (perméabilité) du stent à réaliser une anastomose fonctionnelle nécessite l'utilisation d'animaux vivant.

Le modèle animal utilisé est celui du mini-porc Göttingen-like adultes non-obèses et non-diabétiques (sains). La fiabilité et la reproductibilité de la mise en place du court-circuit gastro-intestinal nécessitent utilisation d'un certain nombre d'animaux en établissant un suivi postopératoire : évolution du poids, des contrôles endoscopique (fibroscopie) et radiologique (Transit Oeso-Gastro Duodéal (TOGD) réguliers, des repas-tests vigiles et standardisés. Puis, l'exploration des modifications métaboliques sera poursuivie sur le modèle mini-porcs diabétiques. La pertinence du modèle porcin tient sur sa ressemblance sur le plan anatomique et physiologie à l'Homme, permettant de démontrer l'efficacité du stent à réaliser une AGI perméable et durable et l'effet métabolique bénéfique sur homéostasie du glucose tels que cela a été rapporté après la chirurgie du bypass gastrique.

Ce projet rentre dans le cadre d'une étude préclinique permettant de préparer un essai clinique sur la gastro parésie. Ainsi, l'utilisation de ces animaux de choix est nécessaire afin de proposer rapidement un essai clinique. Nous utilisons 100 mini-porcs, un effectif réduit au minimum afin de réaliser toutes les investigations nécessaires pour sécuriser et valider cette nouvelle procédure du bypass gastrique tout en apportant des effets métaboliques statistiquement exploitables. Tous les protocoles d'essais sur ces animaux sont planifiés de façon à respecter leur sensibilité et leur bien être en évitant des perturbations à la fois lors du transport et tout au long de leur l'hébergement à l'animalerie lors des expériences. Par ailleurs, les soins en pré- et post-opératoire et l'enrichissement de leur milieu sont assurés tout au long des protocoles afin de réduire voire supprimer la douleur ou l'angoisse des animaux. Des points limites spécifiques et des critères d'arrêt seront utilisés pour éviter toute souffrance.

12834 En France, le cancer de la prostate représente la 2ème cause de mortalité par cancer chez l'homme (11 % des décès par cancer), ce qui le classe au 1er rang des priorités thérapeutiques. Dans certains cancers de la prostate, des mutations peuvent affecter le récepteur des androgènes. Le récepteur reste alors actif (c'est à dire qu'il régule ses gènes cibles), même en absence d'hormone (cancers de la prostate hormono -indépendants). Ce cancer peut également s'étendre à distance et former des métastases, après un certain temps d'évolution, surtout dans les os et les ganglions abdominaux, parfois dans le cerveau, les poumons et le foie.

Notre société de biotechnologie développe des solutions thérapeutiques innovantes en cancérologie en utilisant une technologie qui nous permet de bloquer l'expression des gènes impliqués dans la prolifération et la survie des cellules tumorales.

Nous concentrons nos efforts initiaux sur la mise au point de médicaments pour soigner les cancers de la prostate devenus résistants aux traitements. Ainsi nous avons développé des molécules ciblant le récepteur des androgènes y compris quand celui-ci a subi des mutations pour devenir 'hormono-résistant'.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de nos médicaments sur des animaux porteurs de tumeurs prostatiques greffées en sous-cutanée chez la souris Nude, ainsi que d'évaluer l'effet du traitement sur la dissémination métastatique.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer Les modèles de culture in vitro ne recréent ni la diversité de l'environnement des tumeurs ni la difficulté pour une molécule d'atteindre les cellules cibles au sein d'une tumeur ou les sites des disséminations (cellules métastatiques), rendant le recours à l'animal nécessaire. La recherche et le développement de médicaments en oncologie (administration de substances / galénique) ne peuvent trouver des réponses qu'en étudiant la croissance tumorale in vivo et l'effet de distribution dans une souris entière. De ce fait, le modèle in vivo permet de s'affranchir de ces limitations permettant ainsi au modèle d'être plus représentatif de ce qui se passe dans la réalité.

Réduire : Le nombre de souris Nude nécessaire à cette étude est de 450 au maximum sur 5 ans (90 souris par étude) à raison de 15 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs avec une prise tumorale de l'ordre de 75%) avec 6 groupes de souris recevant le traitement contrôle (excipient seul) ou les molécules à tester à différentes doses et avec différents excipients affectant l'administration. Ce projet pourra être réalisé 5 fois sur 5 ans soit un nombre total d'animaux de 450 souris (répétitions nécessaires car 5 molécules innovantes à tester avec plusieurs modèles variés du cancer de la prostate).

Raffiner : Les traitements seront administrés pendant environ 30 jours via une mini- pompe (Alzet) placée en sous-cutané. La démarche de traiter via une administration continue (mini-pompe) sous-cutanée permet de s'affranchir d'une injection quotidienne chez les animaux pendant la durée du traitement améliorant ainsi leur bien-être selon la règle des 3 R Avant chirurgie, en plus d'une anesthésie générale, les animaux recevront une anesthésie locale et un AINS pour réduire la douleur. Après opération, l'animal sera surveillé jusqu'à son réveil total avec une source de chaleur et le site sera particulièrement suivi de près pour tout signe d'irritation de peau, d'infection ou d'ouverture de la plaie et vérifier l'emplacement de la pompe pour s'assurer qu'elle ne gêne pas l'animal dans ses mouvements : apparence, posture, mobilité.

Les animaux seront remis dans leur cage lorsqu'ils seront pleinement conscients. Nourriture et eau seront offerts une fois que les animaux seront alertes. L'absence de prise alimentaire, des difficultés à se déplacer normalement, des vocalisations inhabituelles, ou l'absence de cicatrisation normale de la plaie pourront évoquer des complications post-opératoires. Dans ce cas, un vétérinaire sera consulté.

L'efficacité sera alors évaluée par suivi de la croissance tumorale au cours du temps par des mesures non invasives au pied à coulisse et par l'étude de la dissémination métastatique qui se fera par imagerie moléculaire.

Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours y compris le weekend où le personnel de la zootechnie viendra s'assurer du bien-être des animaux. Les animaux seront examinés afin de détecter des éventuels signes de douleur ou de détresse, d'inconfort ou toute modification significative du comportement des animaux (consommation alimentaire et hydrique, perte de poids, apparence, posture, mobilité, vocalisations). Nous séparerons les animaux incompatibles, et si nécessaire, nous apporterons des soins (analgésiques, conseils vétérinaire). De plus, afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, une variété d'éléments d'enrichissement sera fournie (tissus, Neslets, Igloos) dès l'arrivée.

12835 L'obésité est reconnue comme une maladie chronique par l'OMS depuis 1997, définie comme "une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». Les études épidémiologiques indiquent qu'en 2015, environ 2,3 milliards d'adultes étaient en surpoids, dont plus de 700 millions d'obèses. Cette prévalence inquiétante s'accompagne en outre d'une mortalité importante: on attribue directement à l'obésité environ 3,5 million de décès par an au niveau mondial. Face ce contexte, l'armada thérapeutique s'avère particulièrement pauvre, et s'accompagne de posologies contraignantes et d'effets secondaires non négligeables. Parmi les traitements autorisés sur le marché, le médicament X (nom sujet à confidentialité) présente ainsi l'inconvénient de devoir être administré par voie sous-cutanée, à des fréquences élevées compte tenu de sa demi-vie faible (2 administrations/jour). L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un industriel pharmaceutique qui développe des

composés thérapeutiques dans le domaine des troubles métaboliques. Cet industriel a notamment développé une nouvelle forme de galénique (matrice sous-cutanée) permettant une libération lente et prolongée du médicament X. En théorie, cette galénique devrait largement améliorer la biodisponibilité du médicament X sur le long terme tout en diminuant l'amplitude de ses effets secondaires en évitant les effets de pics plasmatiques. Elle aurait ainsi l'avantage de permettre une réduction drastique des prises pour le patient (une administration par mois) améliorant ainsi largement son confort de vie. La matrice à libération prolongée de notre client a été testée in silico et in vitro et sa bonne tolérance locale au niveau sous-cutané a également été démontrée. Au total, 7 formulations à libération prolongée du médicament X différentes ont été développées et l'objectif du présent projet vise ainsi à déterminer leur profils pharmacocinétiques in vivo, suite à une administration unique par voie sous-cutanée chez le rat. Ces profils seront comparés à ceux obtenus lors d'administrations uniques et répétées du composé X selon sa posologie classique (deux administrations sous-cutanées par jour). Les procédures du présent projet se limiteront ainsi à l'administration des formulations à libération prolongée du médicament X et du médicament X sous sa galénique initiale suivie de prélèvements sanguins répétés pour dosages des composés et détermination des profils pharmacocinétiques. Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de mieux sécuriser le développement de leurs composés en permettant une sélection et une classification de ses leads sur des critères pharmacocinétiques.

Pour cette étude, un total de 54 rats Sprague Dawley mâles sera nécessaires, séparés en 8 groupes expérimentaux.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

Remplacer: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude des paramètres pharmacocinétiques

Réduire: Le nombre d'animaux utilisés par groupe a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour être en mesure d'obtenir des données significatives sur les paramètres pharmacocinétiques étudiés.

Raffiner: Le modèle animal qui sera utilisé est parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études pharmacocinétiques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Notamment, les volumes des prélèvements sanguins en série seront limités au strict nécessaire pour l'élaboration des dosages. Dans le cas du Groupe Médicament X, les prélèvements s'avérant plus fréquents et rapprochés que pour les autres groupes (1/2 vie du médicament X courte et diverses modalités d'étude), l'effectif a été doublé afin de ne réaliser que la moitié des prélèvements sur un même animal. Par ailleurs, les prélèvements seront réalisés par ponction de la veine de la queue à l'aide de micro perfuseurs à ailettes, ces derniers autorisant un prélèvement sanguin en n'insérant que le premier millimètre de l'aiguille dans la veine. Un enrichissement du milieu de vie sera assuré par l'ajout de petites briquettes en bois et de tubes cartons spécifiques pour rat (SAFE). Enfin, bien que le protocole soit relativement peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis. Des critères d'arrêt seront appliqués.

12836 Lors de la réplication, les virus à ARN génèrent des erreurs, des mutations. La réplication de l'ARN viral se fait avec des taux de mutation élevés ce qui crée un « nuage » de variants, présentant certaines mutations potentiellement bénéfiques, et qui permettent aux populations virales une plus grande probabilité d'évolution et d'adaptation à de nouveaux environnements ou défis lors de l'infection. Nous avons précédemment démontré que l'étude de l'infection et de l'évolution virale naturelle chez la souris permet d'identifier les mutations virales permettant au virus d'élargir son tropisme. Ainsi, nous avons pu identifier les mutations qui étaient à l'origine de l'épidémie du virus de chikungunya en 2005/2006, après seulement deux semaines d'étude. Ces études démontrent que l'évolution naturelle en laboratoire pourrait nous placer en amont des prochaines épidémies, en améliorant la surveillance et la recherche de nouveaux composants antiviraux contre les souches virales à venir. Actuellement, nous travaillons sur le virus Usutu, un virus apparenté au virus de la dengue, qui circule entre moustiques et animaux vertébrés. Bien que ce virus n'ait pas encore

déclenché une épidémie chez l'homme, des infections chez l'homme sont observées depuis plusieurs années. Il est donc nécessaire de mieux étudier ce virus, et son évolution chez les moustiques et chez le mammifère, avant que celui-ci déclenche un véritable cycle urbain. Le but de ce projet est de suivre l'évolution virale en laboratoire afin de prédire les prochaines mutations les plus susceptibles d'émerger dans la nature. Ce projet inclut deux procédures de sévérité modérée. La première, sert à faire évoluer le virus dans des conditions naturelles chez le moustique et chez la souris. Pour ce faire, des souris seront infectées avec le virus transmis par piqûres de moustiques infectés, et l'éventuelle évolution virale sera étudiée par séquençage du virus dans les différents organes de moustique et de souris. Si des nouvelles mutations sont identifiées lors de cette première procédure, la deuxième procédure visera à comprendre in vivo les bénéfices apportés au virus par ces mutations. L'identification de telles mutations pourrait nous aider à améliorer la surveillance de ce virus et à trouver de nouvelles cibles antivirales.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Le recours à l'animal est nécessaire car l'évolution virale en culture cellulaire ne reproduit pas totalement ce qu'il se passe au sein d'un hôte infecté et la confirmation d'atténuation virale nécessite un modèle animal. Néanmoins, nous allons d'abord suivre l'évolution virale en culture cellulaire en utilisant plusieurs types cellulaires pour mieux comprendre son potentiel évolutif.

Réduire : Les expériences seront réalisées sur des souris femelles ou mâles âgées de 5 à 6 semaines. Un maximum de 1740 souris sera nécessaire sur une durée de 5 ans (ce nombre minimum nécessaire a été validé par un statisticien). Nos analyses statistiques nous permettent de limiter le nombre de souris à 5 ou 6 pour chacune des procédures expérimentales et chaque temps d'analyse.

Raffiner : L'infection n'est pas létale, et les souris devraient être mises à mort avant le développement clinique de la pathologie pour prélèvement d'organes et détermination de la charge virale. Cependant, des points limites ont été définis, et les souris seront suivies quotidiennement pendant les 7 jours d'infection et mises à mort si ces points limites sont atteints.

12837 En élevage, les poulains sont le plus souvent séparés totalement de leur mère vers six mois, sans aucune préparation. Ce sevrage artificiel et précoce entraîne un stress important, une perte d'état physique, voire l'apparition de stéréotypies. Pour limiter ce stress, certains éleveurs habituent progressivement les poulains à se séparer de leur mère : à partir de l'âge de 6 mois environ, ils éloignent chaque jour le poulain de la mère pendant quelques minutes à l'aide d'une barrière. Après un mois environ de séparation quotidienne, la séparation définitive a lieu : la mère est mise à distance du poulain afin qu'ils ne puissent plus communiquer. D'après les éleveurs qui l'utilisent, cette pratique permet de limiter considérablement le stress du sevrage, mais elle n'a jamais été testée scientifiquement. Par ailleurs toutes les études réalisées sur le sevrage chez les équins négligent systématiquement d'étudier l'état de stress des mères induit par le sevrage alors que des conséquences sur leur santé physique et psychique sont fortement probables. L'objectif du projet est de déterminer si cette technique de sevrage progressif permet de diminuer le stress chez le poulain, mais également chez la jument. L'originalité est d'évaluer les effets du sevrage sur le stress et le bien-être par des observations comportementales, mais aussi par des indicateurs biologiques et une approche transcriptomique, permettant de fournir une signature biologique précise des effets du stress. 32 mères et leurs 32 poulains de race Welsh seront étudiés. Ils seront divisés en deux lots de 16 diades mères/jeune, l'un qui subira un sevrage sans préparation, l'autre un sevrage progressif.

Prise en compte de la règle des 3R :

Remplacer : Compte tenu de l'objectif du projet qui est d'améliorer le bien-être dans l'espèce équine, le modèle animal ne peut être substitué par un autre type de modèle.

Réduire : Les poulains seront deux par box. L'unité statistique sera donc le box (constitué de 2 mères et/ou 2 jeunes). Nous aurons donc 8 unités statistiques par lot, ce qui est un nombre minimum

pour envisager des différences statistiques entre lots au regard de nos précédentes expérimentations.

Raffiner : Les animaux seront hébergés en box avec paddock attenant. Chaque enclos comportera 2 mères et leurs 2 jeunes ensemble (avant sevrage), puis 2 mères et 2 jeunes séparément (après sevrage). Cela permettra de ne jamais isoler un animal pendant toute la procédure expérimentale, et de limiter ainsi le stress. La procédure « servage standard » ne fait que reproduire la pratique la plus couramment utilisée sur le terrain. Lors des prélèvements, en cas d'agitation trop importante ou de signes excessifs de nervosité, l'animal sera sorti du dispositif expérimental et remis en contact avec ses congénères. Toutes les manipulations se feront sans aucune douleur pour les animaux. Les animaux disposeront de litière de paille, de foin et d'eau à volonté. Aucun animal ne sera isolé au cours des manipulations ou des prélèvements. Aucun dommage ne sera induit sur les animaux, ils retourneront à l'élevage à l'issue de l'expérimentation.

12838 Les maladies auto-immunes sont un groupe de pathologies qui touchent 5% de la population des pays occidentaux. Elles sont dues à une dérégulation du système immunitaire qui s'attaque aux biomolécules du corps humain de manière inexplicée. Bien que ces pathologies (tel le diabète ou la sclérose en plaque) soient différentes de par les organes touchés, les thérapies utilisées et la cinétique d'évolution, des recherches récentes ont pu démontrer que le microbiote intestinal joue un rôle important dans leur développement.

La myasthénie gravis (MG) est une maladie auto-immune touchant les muscles striés squelettiques. Elle est caractérisée par une attaque de la jonction neuromusculaire postsynaptique par des anticorps dirigés notamment contre les récepteurs à l'acétylcholine. Il en résulte une faiblesse musculaire fluctuante et une fatigabilité excessive. Le pronostic vital du patient peut être engagé si les muscles respiratoires sont touchés. A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif pour la MG. Les traitements thérapeutiques actuels sont essentiellement symptomatiques ou non spécifiques. De plus, ils doivent être pris à vie. La prise d'antibiotiques qui modifient le microbiote intestinal induit une aggravation de l'état clinique des patients MG.

Notre projet a pour but de comprendre l'impact du microbiote intestinal sur les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de la myasthénie gravis, pour améliorer la prise en charge des patients myasthéniques.

Dans ce projet, d'une durée de 5 ans, une seule procédure expérimentale est nécessaire pour répondre à nos objectifs. Nous utiliserons en effet le modèle expérimental classique de MG qui consiste à immuniser les souris avec le récepteur à l'acétylcholine. Nous utiliserons 64 souris femelles âgées de 4 à 6 semaines en début de protocole, ce qui correspond à la période de puberté pendant laquelle la MG s'installe.

Toute la démarche scientifique a été établie afin de respecter la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) et obtenir des résultats statistiquement pertinents avec le minimum d'animaux possible (nombre déterminé avec le logiciel G*power). En effet, cette analyse in vivo ne peut être remplacée par des études conduites in vitro du fait de l'absence de modèle cellulaire in vitro reproduisant simultanément l'intestin, le thymus et la jonction nerf/muscle. La procédure expérimentale est classée comme modérée. Un suivi quotidien des animaux sera assuré et nous avons défini des points limites pour limiter au maximum l'inconfort et la douleur des souris.

12839 *Coxiella burnetii* est une bactérie retrouvée partout dans le monde et à l'origine d'une maladie humaine appelée fièvre Q. Il s'agit d'une des maladies bactériennes les plus contagieuses connues qui provoque une phase aiguë, qui se traduit entre autres par de la fièvre, des maux de tête, des douleurs musculaires, des symptômes gastro-intestinaux comme nausées, vomissements et diarrhées et parfois des pneumonies sévères. Elle peut dans certains cas être à l'origine d'une forme chronique provoquant des endocardites, pouvant être fatales. Les réservoirs de la bactérie sont principalement les mammifères sauvages et domestiques, qui vont ensuite la transmettre par voie aérienne lors de l'exposition à leurs fluides infectés tels que l'urine, le sperme, le lait mais aussi le placenta.

Le rôle des tiques a ensuite été montré dans ce cycle d'infection comme étant l'arthropode vecteur pouvant effectuer la transmission de *C. burnetii* entre animaux, la voie d'infection chez l'homme étant principalement respiratoire.

Cependant, il a été publié que *C. burnetii* a été retrouvé dans des moustiques du genre *Aedes* capturés dans la nature. Par ailleurs, la bactérie se développe de façon normale dans des cellules d'*Aedes aegypti*. Ceci pose la question du rôle que pourrait jouer ces moustiques dans la transmission de cette bactérie. Les moustiques *Aedes* sont omniprésents, plusieurs espèces comme l'*Aedes albopictus* et l'*Aedes aegypti* sont invasives dans plusieurs régions du monde actuellement. Déjà des menaces non négligeables en raison de leur capacité à transmettre de nombreux arbovirus, il est crucial d'évaluer s'ils sont également capables de transmettre une bactérie si contagieuse, à l'origine de cas potentiellement sévères.

La détection d'un agent pathogène dans un arthropode vecteur ne suffit pas pour supposer une transmission. Pour pouvoir la démontrer, il faut étudier le cycle complet en laboratoire, avec les 3 éléments de ce cycle, à savoir, le pathogène (ici *C. burnetii*), le vecteur à étudier, et un hôte animal. Un arthropode est réellement vecteur d'un pathogène s'il est capable de le transmettre à un hôte de façon viable. Un animal est donc nécessaire pour démontrer que *C. burnetii* est transmise vivante, et capable d'induire une bactériémie (remplacer).

Ici, des souris Balb/C mâles seront infectées puis exposées à des piqûres de moustiques non infectés. Des souris saines seront ensuite exposées aux moustiques potentiellement infectés précédemment. 30 souris seront incluses dans ce projet car l'expérience sera réalisée 3 fois, et inclura 9 souris par essai. 3 souris supplémentaires sont incluses en cas de manipulation à répéter (réduire). Les souris seront hébergées dans une animalerie A3, et seront par 4 dans des cages contenant des igloos et de la paille pour nicher. Elles seront surveillées quotidiennement par du personnel habilité. Une grille de Morton et Griffiths sera utilisée pour le suivi de la douleur des animaux infectés. Ici, la physiopathologie de la fièvre Q chez la souris ne sera pas étudiée. Pour cette raison, nous ne laisserons aucun animal développer de signes cliniques de maladie. Tout signe de douleur et/ou souffrance entraînera l'arrêt de la procédure et les animaux seront euthanasiés par surdosage de pentobarbital (raffiner).

12840 Dans le cadre de la thérapie génique, nous cherchons à optimiser la délivrance d'acides nucléiques codant des gènes d'intérêt thérapeutique à l'aide de vecteurs synthétiques. Dans ce but, notre équipe cherche à produire des vecteurs synthétiques optimisés pour délivrer des plasmides dans un organe cible.

La règle des 3R sera approchée de cette manière :

- Nous remplacerons dans la mesure du possible l'expérience sur les animaux. Mais en ce qui concerne les expériences de vaccination, il n'existe pas de système immunitaire "dans un tube à essais", nous devons donc valider l'efficacité de la vaccination de nos vecteurs synthétiques *in vivo*.

- Nous réduirons le nombre d'animaux utilisés en effectuant un premier screening *in vitro*. Après cette première sélection, l'usage d'un modèle *in vivo* à ce niveau de notre recherche est néanmoins indispensable afin d'évaluer le comportement de nos vecteurs synthétiques lors d'une injection dans le sang ou différents tissus (musculaire, cutané, pulmonaire, hépatique). En effet, l'influence de l'environnement (organe, sang) *in vivo* tant par sa mécanique que par sa composition peut entraîner des modifications de comportement que l'on ne peut évaluer *in vitro*. Par ailleurs, l'évaluation des vecteurs sera effectuée dans la même souche de souris, au même âge et même sexe afin de pouvoir les comparer entre eux et de ne pas renouveler les contrôles déjà effectués.

- En ce qui concerne le raffinement, l'efficacité du transfert de gène *in vivo*, nous utilisons des vecteurs de transfert d'acides nucléiques qui ne fonctionnent pas *in vitro* sur des cellules en culture. Nous sommes donc obligés de réaliser des expériences sur animaux afin de valider l'efficacité de cette nouvelle classe de vecteur. Ainsi, au cours de chaque procédure expérimentale, les animaux seront pris en charge via des mesures visant à réduire la douleur. Une anesthésie (isoflurane) sera toujours réalisée, ainsi qu'une analgésie (tétracaïne) dans les cas nécessaires. Entre 1h et 3h après les injections ou les prélèvements, les animaux seront examinés afin de vérifier leur bien-être, puis

une visite quotidienne aura ensuite lieu pour vérification de leur état de santé, selon des points limites définis avec des soins adaptés et des critères d'arrêt. Si un seul point limite est observé, la surveillance de l'animal est accrue. Ces observations permettent d'effectuer une estimation de la douleur générée et, le cas échéant, de mettre en place des moyens adaptés pour la soulager de façon appropriée, efficacement et sans interférence avec le protocole.

La mise en place de ce projet répondra à de nombreuses questions avant de pouvoir envisager l'usage de ces systèmes chez l'homme. Selon les données antérieures de l'équipe (nombres de vecteurs validés in vitro, conditions testées), on peut estimer à 450 le nombre de souris utilisées sur les 5 ans pour mener à bien les caractérisations.

12841 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) incluant la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique touchent chaque année quelques milliers de personnes en France. Ces maladies inflammatoires du tube digestif évoluent par alternance de phases dites de « poussées » et de phases de rémissions. Les symptômes comprennent diarrhée, fièvre, douleurs abdominales, fatigue et perte d'appétit. Le manque de connaissance sur l'étiologie de ces deux maladies et la grande hétérogénéité des symptômes rendent le traitement difficile. L'objectif thérapeutique qui était autrefois une réduction des symptômes, a récemment évolué vers un objectif de « rémission physiologique » regroupant à la fois la réduction des symptômes et la régénération de l'intestin. Les nouvelles thérapeutiques dites « biologiques », ont constitué une grande avancée, mais elles restent très coûteuses et ne sont pas toujours efficaces. La mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques apparaît dès lors nécessaire. Le but de notre travail est de tester des molécules à viser thérapeutique.

Les effets pléiotropiques des molécules et les enjeux thérapeutiques sous-jacent rendent indispensable l'utilisation de modèles in vivo. Nos modèles d'inflammation et de douleur intestinales sont indispensables pour étudier les effets d'une molécule sur un organisme entier et pour accélérer le passage en clinique chez l'homme. Les modèles animaux sont devenus essentiels pour déterminer les mécanismes physiopathologiques et les processus immunologiques à l'origine de l'inflammation chronique des muqueuses et de la douleur. A ce jour, il existe de nombreux modèles décrits dans la littérature, tous induisent chez l'animal (avec un degré de sévérité plus ou moins important), une perte de poids, un ramollissement des fèces et diarrhée ainsi qu'une présence de sang dans les fèces. Cependant, aucun de ces modèles ne présente tous les critères de la pathologie humaine. Le modèle animal à considérer doit être choisi selon les aspects de la maladie humaine qu'il doit reproduire.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques pour les MICI chez la souris. Le modèle utilisé sera adapté aux cibles thérapeutiques à évaluer. Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 4880 souris en raison de 12 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Dès l'induction de la pathologie, les animaux seront suivis régulièrement au cours du temps (de 7 jours et jusqu'à 6 semaines selon le modèle) par des techniques non-invasives : suivi du poids, consistance des fèces et présence de sang dans les fèces, évaluée par le test Hémocult II®. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet d'observer au cours du temps un seul animal, là où l'information devait être obtenue par euthanasie et autopsie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude, permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux. De plus, afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement sera ajouté dans la cage des animaux. A savoir, dans un premier temps, des carrés de coton pur ou du papier absorbant permettant aux animaux de faire une nidation. Selon la durée de l'étude, un deuxième enrichissement pourra être introduit dans l'environnement, tel que des aspen Brick, des tunnels en polycarbonate ou des igloos. Une étude rétrospective sera effectuée à la fin de chaque expérience pour déterminer les possibilités de diminution du nombre d'animaux et/ou d'amélioration des procédures pour diminuer la souffrance animale. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé quotidiennement. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt. Si l'utilisation d'un modèle animal reste nécessaire pour atteindre l'objectif de ce

projet, une veille bibliographique sera effectuée pour déterminer si des méthodes de remplacement ont été mises en place. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (Remplacer, Réduire, Raffiner).

12842 Le tube digestif est un milieu complexe, source de nombreuses maladies, comme les maladies inflammatoires chroniques intestinales (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) et les infections bactériennes d'origine alimentaire (listériose et salmonellose). De nouvelles approches sont en cours de développement pour viser des cibles thérapeutiques capables de réduire ces troubles intestinaux. Nos travaux visent l'étude des interactions entre le microbiote (microorganismes résidents du tractus digestif) et les cellules du système immunitaire de l'intestin, et leurs impacts sur la défense de l'organisme contre les infections bactériennes et le développement d'inflammation de la paroi du tube digestif.

Plus précisément, le projet présente pour objectif de comprendre les mécanismes d'interactions entre le système immunitaire et le microbiote en situation normale et en situation pathologique. Il se déroulera sur 5 ans et nécessitera un total maximum de 436 souris /an, soit 2184 souris au total. Afin de précisément définir les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'inflammation et le rôle du microbiote dans ces maladies, trois types de modèles d'inflammation ou d'infection intestinale seront utilisés. En parallèle, dans ces différents modèles, le microbiote en lui-même pourra être modifié par différents moyens : utilisation d'antibiotiques, ensemencement de bactéries dans le tube digestif de souris normales ou de souris élevées stérilement depuis la naissance (axéniques). L'essentiel des prélèvements (sang, tissus, contenus intestinaux) sera fait post mortem à l'exception des fèces.

Application de la règle des 3R,

Remplacer : L'étude de ces écosystèmes impose le modèle animal pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations in vitro. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle in vitro récapitulant tous les paramètres du tube digestif.

Réduire : Nous avons prévu dans nos projets scientifiques d'utiliser des expérimentations in vitro sur des lignées cellulaires préalablement à l'utilisation d'animaux, ce qui permet d'en réduire le nombre. Nos groupes de souris seront réduits à 6 animaux. Ce nombre d'animaux est calculé au plus juste en fonction de notre expérience antérieure pour garantir la qualité statistique des données.

Raffiner : Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulées, ...). Nous avons veillé à enrichir le milieu de vie par l'ajout de feuilles de cellulose dans les cages et d'un abri prévu à cet effet. Le suivi attentif et régulier des animaux sera réalisé afin de minimiser autant que possible la souffrance éventuelle des animaux. Dans tous les cas, l'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement afin d'évaluer au plus près l'évolution de l'inflammation induite par les protocoles expérimentaux et d'optimiser le bien-être des animaux. Des points limites ont été établis et mèneront à l'euthanasie des animaux si ceux-ci sont franchis. Ces animaux sociaux sont hébergés en groupe, jusqu'à 5 animaux par cages. Tous les animaux seront euthanasiés sans souffrance en fin d'expérimentation.

12843 Le déclenchement d'un mouvement volontaire est initié dans les structures motrices cérébrales, mais l'activité doit se propager à la moelle épinière pour que l'action soit exécutée. Chez les primates, plusieurs voies nerveuses sont impliquées dans la transmission de la commande motrice. La voie cortico-spinale connecte directement le cortex cérébral à la moelle épinière et joue un rôle particulièrement important chez les primates dans le contrôle des mouvements du bras et de la main. Cependant d'autres voies moins directes contribuent également au contrôle du mouvement. Des travaux antérieurs ont démontré que parmi ces voies, la voie réticulo-spinale issue de la formation réticulée est particulièrement développée chez les primates et serait également impliquée dans le contrôle des mouvements de la main. L'existence de cette voie parallèle est particulièrement critique en cas d'accident vasculaire cérébral ou de lésion de la moelle épinière touchant les fibres cortico-spinales et entraînant une paralysie. Dans cette situation, la récupération fonctionnelle

pourrait s'appuyer sur un renforcement des connexions réticulo-spinales, facilitant ainsi le transfert des commandes motrices vers la moelle épinière par cette voie parallèle. Malgré son importance potentielle, les propriétés de la voie réticulo-spinale chez le primate restent peu étudiées par rapport à celles de la voie cortico-spinale, qui font l'objet de recherches plus intensives.

Au cours du vieillissement, les mouvements deviennent plus lents et moins précis. De plus, les personnes âgées perdent progressivement de la masse musculaire. Ces évolutions peuvent entraîner une fragilité importante et un risque accru de blessures, en particulier lors de chutes qui sont la cause la plus fréquente de l'hospitalisation des personnes âgées et sont à l'origine d'environ 25 % de tous les appels d'ambulance dans le monde occidental. À mesure que l'espérance de vie augmente, la proportion de personnes en bonne santé mais vivant avec une déficience motrice liée à l'âge augmentera rapidement. Face à ce défi sociétal majeur, il est urgent de mieux comprendre les processus neuronaux responsables de ces déficiences en vue de développer des stratégies permettant de ralentir ou de contrer ces évolutions. Nous faisons l'hypothèse qu'une atteinte progressive des connexions entre le cerveau et la moelle épinière contribue de manière prépondérante aux déficits du contrôle moteur liés à l'âge.

Dans ce projet, édifié dans le respect de la règle des 3R, nous testerons cette hypothèse chez le singe macaque rhésus qui présente un système de contrôle neuronal du mouvement très similaire à celui des humains. Chez le singe rhésus comme chez l'humain, la voie cortico-spinale qui lie le cortex moteur à la moelle épinière est la principale voie de contrôle du mouvement et son atteinte pathologique entraîne des déficits moteurs profonds et irréversibles. Elle est constituée de fibres présentant une vitesse de conduction particulièrement rapide et dont les projections se distribuent selon une organisation spécifique vers les motoneurons des différents segments spinaux. Ces caractéristiques sont absentes chez les mammifères inférieurs tels que les rongeurs ou d'autres espèces de primates non-humains tels que le marmouset

Remplacer : L'analyse par imagerie IRM de diffusion dont l'usage doit être transposé à l'homme, ne peut se faire avec des approches « in vitro »

Réduire : Afin d'étudier les conséquences du vieillissement sur cette organisation, nous injecterons des traceurs anatomiques dans les zones du cerveau à l'origine des voies cortico-spinales et réticulo-spinales. Pour satisfaire à l'exigence de réduction du nombre d'animaux, plusieurs injections seront réalisées chez chaque animal à l'aide de traceurs anatomiques associés à différentes protéines fluorescentes. Cette approche permettra ainsi de comparer directement et chez chaque animal, le nombre et la distribution des projections cortico-spinales et réticulo-spinales.

Raffiner : Pour minimiser les risques d'échec, l'ensemble des procédures seront réalisées avec le soutien d'un expert spécialiste de ces approches anatomiques. Une intervention chirurgicale sera réalisée pour l'injection des marqueurs. Cette procédure sera réalisée dans une salle de chirurgie présentant tout l'équipement nécessaire à la réalisation d'une anesthésie minutieusement contrôlée. Afin d'éviter la déperdition de chaleur de l'animal, celui-ci sera installé sur une couverture chauffante. La procédure sera réalisée sous anesthésie générale gazeuse avec un suivi constant des paramètres physiologiques (en particulier fréquence cardiaque et respiratoire) permettant de détecter tout signe de souffrance et d'ajuster la profondeur de l'anesthésie en conséquence. La procédure d'injection sera également raffinée par une cartographie fonctionnelle des différentes structures cibles par micro-stimulations électriques intracérébrales pour un contrôle plus précis des sites d'injection et une meilleure reproductibilité de la procédure entre les différents animaux. En post-chirurgie, les singes recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, complété si nécessaire par un traitement antibiotique. Pendant la période de marquage de 8 semaines, ils seront placés dans leur hébergement par paire ou en petits groupes sociaux avec accès illimités à des volières enrichies en zones de fourrages, portoirs et balançoires. Durant cette période, les traceurs seront absorbés par les neurones présents aux sites d'injection et transportés jusqu'à la moelle épinière par les fibres axonales de ces neurones. Cette phase de transport des marqueurs est totalement indolore pour les animaux qui vivent une vie normale dans leur hébergement. Leur état de santé est surveillé quotidiennement. En fin de marquage, les animaux sont mis à mort pour extraire la moelle épinière. Nous pourrions alors visualiser la distribution spatiale des projections en provenance des zones cérébrales à l'origine des voies cortico-spinales et réticulo-spinales afin de

déterminer comment ces voies motrices sont organisées pour influencer l'activité spinale. En vue d'analyser les effets du vieillissement sur cette organisation, cette étude sera réalisée chez quatre jeunes singes adultes en bonne santé ainsi que chez quatre animaux âgés. Ce nombre a été fixé en prenant en compte le taux de succès partiel des techniques de marquage anatomique (d'environ 50 %) et la nécessité de reproduire les résultats du marquage chez au moins 2 animaux pour répondre aux critères de validation de la communauté scientifique. Le nombre total d'animaux sera revue à la baisse en cas de résultats positifs dès les premières expériences.

12844 Le cancer du poumon est aujourd'hui la première cause de décès par cancer en France et dans le monde. Nos travaux ont montré que les tumeurs pulmonaires humaines présentent des voies métaboliques remaniées, mettant en évidence une vulnérabilité métabolique de ces cancers. En d'autres termes, les modalités de production d'énergie au sein des tumeurs diffèrent des tissus normaux et il est aujourd'hui possible d'identifier des mécanismes de survie au plan bioénergétique, spécifiques aux cellules cancéreuses, que nous proposons de bloquer pour les tuer.

Nos résultats ont ainsi permis d'élaborer une nouvelle approche thérapeutique ciblant le métabolisme tumoral que nous proposons d'évaluer au stade préclinique. Ce projet a été évalué favorablement par les instances scientifiques d'organismes financeurs nationaux.

En particulier, nous avons identifié un médicament utilisé en cardiologie qui cible la vulnérabilité métabolique des tumeurs de poumon et entraîne le blocage de la production d'énergie et consécutivement, l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses. Afin de progresser vers le repositionnement de cette molécule dans le traitement ciblé du cancer du poumon, nous devons apporter une preuve de concept (POC) in vivo et établir une preuve de mécanisme génétique et pharmacologique (POM) in vivo. Pour cela, un modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire est indispensable. Le remplacement par une méthode alternative est impossible.

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences un total de 320 animaux. Dans le respect de la règle des 3R, nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort. Notre projet prend en compte le respect des animaux et la participation aux conditions d'enrichissement dans les cages. L'ensemble des animaux sera suivi quotidiennement par du personnel qualifié. Le bien-être des animaux est pris en compte notamment grâce à l'apport de matériaux permettant aux souris de nidifier. Les animaux seront anesthésiés lorsque nous pratiquerons des actes douloureux et recevront en complément un traitement à effet analgésique. De plus, notre domaine d'étude étant la cancérogenèse, nous avons établis des points limites adaptés et des critères stricts d'arrêt de l'expérimentation pour les animaux qui pourraient présenter des signes de souffrances.

Ce projet s'inscrit donc dans une recherche thérapeutique contre le cancer avec des implications à plus long terme en santé humaine.

12845 L'insuffisance rénale chronique (IRC) est une maladie multifactorielle souvent associée à l'hypertension artérielle et au diabète. Si elle n'est pas correctement traitée, l'IRC conduit à la mise en place d'une hémodialyse. La néphrectomie partielle est une procédure chirurgicale expérimentale couramment utilisée chez les rongeurs pour accélérer l'apparition de lésions rénales spontanées. Cette procédure permet ainsi l'obtention de modèles animaux pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la progression vers l'IRC. Elle permet également la mise en œuvre d'études pharmacologiques précliniques visant à tester de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir, freiner, voir stopper, la progression de l'insuffisance rénale chronique.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Les mécanismes étudiés mettent en jeu l'interaction croisée de plusieurs organes, dont la complexité est impossible à reproduire dans un modèle « in vitro », l'usage d'animaux vivants est donc indispensable dans ce projet.

Réduire : Le projet utilise 480 animaux (320 souris et 160 rats). Les espèces utilisées permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux pour atteindre les objectifs du projet

Raffiner : Les procédures utilisées sont optimisées de façon à limiter au maximum leur douleur et leur stress (anesthésie, antalgie, suivi post-opératoire). Les animaux seront observés quotidiennement afin d'évaluer leur bien-être en appliquant des points limites établis au-delà desquels ils seraient euthanasiés.

12846 Mots clés : Neuromyéélite Optique, épendyme, auto-anticorps anti-aquaporine 4, cils moteurs, rat Sprague Dawley.

Rationnel et objectif du projet : La neuromyéélite optique (NMO) est une pathologie neuroinflammatoire rare caractérisée par des lésions démyélinisantes principalement situées au niveau de la moelle épinière et des nerfs optiques. Les principaux symptômes sont des épisodes aigus et souvent sévères de perte de vue et d'une paralysie d'un ou plusieurs membres. Les patients présentent majoritairement des auto-anticorps dirigés contre une protéine appelée l'aquaporine-4 (AQP4) qui est exprimée par les astrocytes (cellules de soutien régulant les échanges entre le sang et les neurones) et les cellules épendymaires (bordent les ventricules cérébraux contenant le liquide cébrospinal (LCS)). Les altérations induites par les anti-AQP4 sur les astrocytes sont bien connues et la NMO est maintenant considérée comme une astrocytopathie auto-immune. Cependant, comme les anti-AQP4 sont aussi présents dans le LCS pendant les attaques, un ciblage des cellules épendymaires est possible. Cette hypothèse est soutenue par l'observation chez les patients NMO d'atteintes ventriculaires en IRM et par histopathologie de tissus autopsiés. L'épendyme possède de nombreux rôles. Il permet de diriger le flux du LCS par le battement de ses cils et de réguler les échanges entre le tissu nerveux et le LCS. Sa fonction est aussi de sécréter des facteurs trophiques pour les cellules souches neurales (NSC) sous-ventriculaires qui sont importantes notamment pour la restauration des dommages cérébraux par production de nouvelles cellules gliales. Une altération de ces fonctions par le ciblage des anti-AQP4 pourrait donc avoir des conséquences délétères pour le système nerveux central (SNC) des patients présentant ces anticorps.

Des travaux précédents ont mis en évidence une altération fonctionnelle astrocytaires liée à la présence des autoanticorps anti-AQP4 dans des modèles cellulaires et animaux. Un modèle animal a été mis en place pour étudier les mécanismes de pathogénicité de ces auto-anticorps. Ce modèle consiste en l'infusion chronique d'auto-anticorps de patients atteints de NMO (NMO-IgG) chez le rat Sprague Dawley dans le ventricule latéral à l'aide d'une pompe osmotique. Cette étude a permis de mettre en évidence une altération de la recapture du glutamate (neurotransmetteur exciteur) associée à une perte axonale et des troubles moteurs. Ces lésions ressemblent en partie à celles décrites chez le patient atteint de NMO. Les résultats obtenus lors de ces expérimentations et le modèle animal de rat NMO serviront de base à la poursuite de la compréhension de la physiopathologie de la maladie.

Pour ce projet, des résultats préliminaires prometteurs ont été obtenus sur des cultures primaires d'épendymocytes de rats. En effet, il a été montré que les IgG-NMO de patients étaient capables de cibler spécifiquement les cellules épendymaires in vitro et in vivo. De plus, il a été observé une modification de l'expression de l'AQP4 et d'un marqueur des cils des cellules épendymaires en culture après traitement avec des IgG-NMO.

Afin de poursuivre l'étude des mécanismes à l'origine de la maladie et d'étudier les fonctions des cellules épendymaires non observables en culture, le recours au modèle animal est indispensable. Nous pensons que, similairement aux atteintes fonctionnelles astrocytaires, une atteinte des fonctions épendymaires est possible. Pour ce projet, nous étudierons les effets des auto-anticorps dirigés contre l'AQP4 sur les fonctions des cellules épendymaires et les cellules souches neurales (NSC) sous-jacentes.

En tout, nous comptons inclure dans ce projet un total de 189 rats Sprague Dawley adultes maximum. Ces animaux seront habitués pendant 7 jours à l'animalerie avant que la pose de la pompe soit réalisée par chirurgie. Les animaux sont ensuite gardés de 3 jours à 21 jours après la chirurgie avant d'être mis à mort pour réaliser des analyses post-mortem. Ces animaux pourront

subir des effets néfastes modérés liés à la chirurgie et à la perte légère de motrice induite par les IgG-NMO. Ce protocole a un degré de sévérité modéré.

Ce projet se déroulera en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

Remplacer : Il est nécessaire de passer au modèle in vivo afin d'étudier les effets des IgG-NMO sur les fonctions épendymaires qui ne sont pas observables in vitro. Ce modèle animal est donc indispensable pour valider notre hypothèse sur les effets délétères qu'ont les auto-anticorps sur les fonctions de l'épendyme.

Réduire : Les effectifs des animaux dans chaque groupe ont été ajustés à un minimum de 5 pour avoir un résultat statistique fiable. Ce chiffre est basé sur nos résultats précédemment publiés où des différences avaient été observées entre des groupes de 4 à 6 animaux. Des expériences complémentaires ne seront pas démarrées si les résultats des immunomarquages de protéines fonctionnelles épendymaires ne donnent pas de résultats significativement différents entre les rats-NMO et rats contrôles. Les coupes histologiques réalisées à différents temps pour une étude serviront pour des analyses histologiques pour différents axes de recherche quand cela est possible.

Raffiner : La bonne connaissance du modèle animal au sein du laboratoire nous permet de déterminer les points limites définis selon une grille de score. Des critères d'arrêt seront utilisés. L'observation et la pesée des rats sera régulière. Des soins et un ajustement de l'antidouleur seront prodigués en cas de nécessité après la chirurgie.

12847 Les connaissances dans le domaine de la biologie du développement ont beaucoup progressé au cours de la dernière décennie. Le cancer est devenu un enjeu de santé publique. La majorité des décès des patients est la conséquence de l'apparition d'une ou plusieurs métastases cancéreuses, c'est-à-dire la dispersion des cellules tumorales dans l'ensemble de l'organisme. A l'heure actuelle, il existe des traitements permettant d'éliminer les tumeurs primaires (chirurgie ou traitements) mais il n'existe aucun moyen d'empêcher l'initiation de cette migration des cellules tumorales vers d'autres organes.

Depuis quelques années, un nouveau modèle animal est apparu dans les laboratoires de recherche: l'embryon de poisson zèbre. Ce petit vertébré, est capable à l'âge adulte de produire jusqu'à 200 œufs par ponte et ceci tous les 5 jours. Ces embryons possèdent 85 % de ressemblance génétique avec l'homme. Ils présentent des propriétés uniques du fait de la transparence de leurs tissus pendant les premiers jours de développement. En 2010, grâce à cela et la mise au point de nouveaux outils de microscopie adaptés à ce petit organisme, il a été démontré que les cellules souches sanguines sont issues de la paroi de l'artère principale (l'aorte) chez ce poisson. Ce mécanisme a été étudié ensuite chez l'homme et s'est avéré similaire.

Or il se trouve que ce mécanisme biologique est similaire au processus de métastase cancéreuse. Les mécanismes impliqués dans l'initiation de la métastase cancéreuse restent peu connus en partie parce qu'il n'existe pas de modèle d'étude in vivo.

Ce projet, dont le modèle d'étude de ce projet reproduit l'ensemble des étapes de la métastase cancéreuse in vivo, vise à apporter des éléments nouveaux dans la compréhension des mécanismes d'action des médicaments anti-métastatiques. Nous souhaitons donc l'utiliser pour isoler des molécules capables d'inhiber l'apparition des cellules hématopoïétiques. Nos hypothèses scientifiques nous font penser que ces molécules pourraient également être capables de bloquer les étapes du processus métastatique cancéreuse. Pour soutenir ces hypothèses, notre projet comporte 2 procédures permettant de réaliser un criblage de molécules puis une analyse des effets de toxicité sur les tissus et d'autre part de faire des évaluations de la toxicité des molécules sur des poissons juvéniles ou adultes. Le 1er modèle utilisé est l'embryon qui est un modèle adapté au criblage. En raison de sa transparence, il permet une analyse in vivo et donc l'obtention d'informations supplémentaires sur un criblage par rapport aux modèles in silico ou in vitro.

L'utilisation du zebrafish pour le criblage de médicaments permet d'analyser précocement les effets de ces composés chimiques in vivo. Il s'agit d'une 1ère sélection qui nous permet ensuite de raffiner

le criblage pour ne sélectionner que les molécules induisant une diminution de la migration des cellules ; ce qui limite ensuite le nombre de molécules en phase préclinique et par conséquent, limite le nombre de mammifères utilisés pour la suite des études. De plus, le zebrafish adulte est reconnu pour être un très bon modèle d'étude en cancérologie. En effet, un grand nombre des cancers observés chez l'homme sont également exprimés chez le zebrafish avec une similitude phénotypique.

Le projet couvre l'utilisation d'au maximum 2700 animaux sur une période de 3 années. Les études réalisées au sein du centre de recherche, par du personnel formé et compétent, sont encadrées par des recommandations internes intégrant tous les aspects en lien avec l'utilisation des animaux (éthique, hébergement, conditions d'environnement, soins, manipulation, expérimentation, observations quotidiennes) et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal (via anesthésiques et antalgiques). Le nombre d'animaux est utilisé au strict nécessaire. Tous ces éléments contribuent et assurent l'application de la règle des 3 R (remplacement, raffinement, réduction).

12848 Les maladies atopiques affectent 40% de la population mondiale, et sont un enjeu de santé public. La marche atopique décrit la succession des maladies atopiques qui apparaissent durant l'enfance. La dermatite atopique (DA), souvent associée à l'allergie alimentaire (AA), est la plus fréquente et la plus précoce des allergies. La DA est une maladie multifactorielle due à l'association de facteurs génétiques et environnementaux. Le rôle précoce d'une anomalie de diversité du microbiote a été mis en évidence. Cependant, la physiopathologie de la marche atopique n'est pas complètement connue et il n'existe aucune stratégie préventive. Or, la grossesse représente une fenêtre d'intervention optimale dans la régulation du processus allergique à travers une modulation des systèmes immunitaire et microbien du fœtus, ce qui en fait une piste prometteuse pour la prévention de l'allergie. Notre étude préclinique a montré chez la souris une diminution de l'AA après une exposition aux prébiotiques durant la gestation et l'allaitement.

L'objectif de ce projet sur 5 ans est de comprendre les mécanismes de l'effet préventif des prébiotiques sur la DA associée à l'AA dans un modèle murin afin de nous permettre d'appréhender la mécanistique et l'efficacité d'une supplémentation anténatale maternelle en prébiotiques sur l'occurrence de la DA. Pour ce faire, nous développerons un modèle murin de sensibilisation per cutanée aux gliadines de blé afin de reproduire les signes cliniques de la DA associée à une AA. Ce modèle murin, dont la physiopathologie est assimilable à l'histoire naturelle de l'allergie de l'enfant, nous servira à tester la stratégie préventive d'une supplémentation anténatale en prébiotiques GOS/Inuline et d'identifier les biomarqueurs de la pathologie. Ainsi, ce projet nous permettra d'acquérir de nouvelles connaissances sur la DA précoce associée à une AA et sur ses biomarqueurs associés.

Dans cette expérimentation, des souris Balb/c reproductrices mâles et femelles seront nourries avant et pendant la gestation avec un régime standard ou enrichi en prébiotiques GOS/Inuline.

Après reproduction, les mères seront maintenues sous régime standard ou prébiotiques durant le temps de la gestation de 21 à 23j.

Dans une première série d'expériences durant 36 mois, les mères gestantes seront conservées et les souriceaux utilisés pour évaluer l'impact du prébiotique sur les paramètres associés à la DA lié à une AA dans la descendance. A la naissance des souriceaux, les deux groupes de mères reviendront à un régime standard ainsi que les souriceaux après sevrage. Ensuite, les souriceaux à 5 semaines de vie seront soumis au protocole de sensibilisation cutanée et d'exposition per os. Pour cela, une fois par semaine pendant 6 semaines, 100 µg d'allergène sera déposé en percutané à l'oreille de la souris (10 souris/groupe). 1 semaine après la période d'exposition cutanée, les souris seront challengées oralement par gavage avec 20 mg d'allergène. Lors du protocole le sang, les fèces et le lait seront prélevés. Puis, au terme de 18 semaines de protocole, les souris seront mises à mort pour prélever les organes et réaliser les analyses. Nous évaluerons la physiologie des barrières (intestin et peau), le microbiote et la composition du sérum (Immunoglobulines, histamine, mMCP1). Les paramètres immuns seront étudiés également par l'analyse des populations cellulaires immunitaires innées et adaptatives au niveau de l'intestin, de la peau et au niveau

systémique (rate et sang). La composition du lait maternel (microbiote et oligosaccharides) sera étudiée. Pour cela nous utiliserons 180 souris reproductrices dont 120 femelles reproductrices sous régime prébiotiques et 60 mâles reproducteurs sous régime prébiotiques. Dans ces conditions nous espérons obtenir au moins 80 souriceaux femelles.

Dans une deuxième série d'expériences durant 24 mois, des mères gestantes seront sacrifiées à 17 jours de gestation pour évaluer l'impact du prébiotique in utero chez la mère et le fœtus. Nous réaliserons des analyses du système immunitaire et des analyses transcriptomique et épigénétique des tissus fœtaux maternelles. Pour cela, nous utiliserons 180 souris reproductrices dont 120 femelles reproductrices sous régime prébiotiques et 60 mâles reproducteurs sous régime prébiotiques.

Un total de 440 souris pour l'ensemble de l'étude sera nécessaire, 360 adultes dont découleront 80 souriceaux.

Ces exigences et le temps visent à s'assurer que les procédures nécessaires à l'élevage et à l'expérimentation seront exécutées efficacement, avec les soins appropriés afin de minimiser la souffrance des animaux.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Il est impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des systèmes in vitro ou in silico. Les modèles animaux d'allergie alimentaire (blé) ont été soigneusement conçus et évalués pour fournir des informations pertinentes pour l'application future à l'Homme. Ces modèles étant bien établis, ils possèdent l'avantage de permettre de réduire au maximum le nombre d'animaux du fait de la connaissance et la précision des paramètres observés.

Réduire : Le nombre important de souris est expliqué par la difficulté des prélèvements à effectuer ainsi que la quantité de tissu et de cellulaire très faible notamment chez les fœtus et les mères porteuses. L'analyse demande également de séquencer les manipulations pour veiller au bien être des souris et la bonne manière des expérimentations scientifiques. Ainsi chaque expérience est réalisée avec 4 souris/groupe, et les expériences seront répétées dans le temps, améliorant les soins prodigués aux souris ainsi que les résultats statistiquement significatifs.

Raffiner : Les animaux seront logés dans un environnement avec une humidité relative, une température contrôlée et bénéficieront d'un enrichissement. Les utilisateurs sont expérimentés. Les sensibilisations et les prélèvements de lait seront faits sous anesthésie. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12849 Le cancer du sein est la première cause de décès par cancer chez la femme. Ces dernières années, des avancées ont permis de classer les tumeurs du sein en différents sous-groupes d'agressivité variable. Toutefois, peu de bénéfices sont encore appréciables quant à la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein. Il est donc crucial de mieux caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la tumorigenèse mammaire.

Nos travaux de recherche nous ont permis d'identifier un gène suppresseur de tumeur comme étant l'un des gènes les plus fortement altérés dans les cancers du sein. En effet, la protéine codée par ce gène confère des propriétés anti-tumorales qui sont perdues dans les cellules cancéreuses de plus de 50% des tumeurs du sein.

Récemment, nous avons mis en évidence que ce suppresseur de tumeur s'associe à une nouvelle protéine cruciale pour la survie des cellules. Grâce à différents modèles cellulaires, nous avons montré in vitro que l'association de ces deux protéines inhibe la fonction suppresseur de tumeur du premier partenaire. Nous envisageons à présent de valider ces résultats in vivo. Les souris recevront l'injection sous cutanée de cellules surexprimant le partenaire du suppresseur de tumeur ou un vecteur contrôle. Le suivi de la croissance tumorale sera réalisé à l'aide d'une technique non invasive consistant à la mesure du volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Après les analyses au niveau cellulaire et au niveau de tumeurs du sein, le modèle murin constitue une étape indispensable pour la validation de notre hypothèse et pour déterminer son potentiel retentissement en clinique.

Réduire : Pour cette première partie du projet, 5 souris seront utilisées. Ce nombre est réduit au maximum et permettra l'obtention de résultats interprétables, et ainsi d'atteindre l'objectif scientifique du projet ou bien de déterminer un nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement concluants.

Raffiner : Les souris seront suivies quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

Ainsi, l'étude proposée devrait nous permettre d'une part, de progresser dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la progression tumorale mammaire, et de caractériser des marqueurs susceptibles d'être utilisés en clinique afin de prédire l'évolution des tumeurs mammaires. A terme, ces travaux pourraient contribuer à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

12850 Environ 20 % des usagers de cocaïne développent une addiction à la drogue. Notre but est de comprendre les mécanismes neurobiologiques à la base de cette vulnérabilité individuelle. C'est en effet une étape décisive pour proposer des outils thérapeutiques fiables actuellement inexistant.

Le rongeur est utilisé depuis 1960 pour modéliser la prise de drogue, généralement sur une courte durée, au travers de la procédure d'auto administration intraveineuse [l'animal est équipé d'un cathéter intrajugulaire à demeure et peut quotidiennement au travers d'un comportement opérant (introduction du museau dans un orifice) obtenir, s'il le souhaite, des injections intraveineuses de drogue]. Néanmoins, l'addiction n'est pas une simple prise de drogue. C'est une prise incontrôlée qui apparaît après un usage prolongé et qui se caractérise par une incapacité à limiter la recherche et la prise de drogue, par une très forte motivation pour la substance et un maintien de l'usage malgré ses conséquences néfastes. Notre équipe a démontré que le rat peut lui aussi faire preuve d'un comportement addictif vis-à-vis de la cocaïne.

La procédure comportementale spécifique que nous utilisons est donc particulièrement adaptée à la question posée. Ce modèle utilise le comportement d'auto administration intraveineuse pour modéliser l'usage de drogue et opérationnalise les 3 principaux critères diagnostiques de l'addiction humaine pour évaluer le caractère addictif de cet usage.

Ce modèle d'addiction est unique, car il permet de comparer des rats montrant des symptômes d'addiction et des rats n'en montrant pas, tous ayant préalablement consommé une même quantité de drogue. Les différences neurobiologiques identifiées entre ces deux groupes sont donc en lien direct avec la vulnérabilité à développer un comportement addictif et non le résultat d'une moindre, ou plus importante, prise de drogue.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Seul le modèle animal permet d'interroger les mécanismes neurobiologiques difficilement accessibles chez l'homme. De plus, l'étude du comportement addictif ne peut se réduire à la simple étude de l'effet de la drogue. Ce comportement met en jeu des mécanismes psychopharmacologiques complexes (conditionnement, perte de contrôle, impulsivité, compulsivité) qui ne peuvent pas être appréhendés par des modèles ex vivo.

Réduire : Dans ce projet nous utiliserons des rats non-consanguins, sur une période de 5 ans. L'utilisation d'un trop grand nombre d'animaux est contraire à l'éthique, mais si trop peu d'animaux est utilisé, l'expérience peut manquer de puissance statistique. Ainsi, compte tenu du risque individuel de dépendance, des différences individuelles dans la nature de cette dépendance, du pouvoir statistique limité des analyses corrélatives menées sur un nombre limité d'animaux, ainsi que sur la base des travaux déjà réalisés, nous évaluons à 816 le nombre maximum d'animaux nécessaires pour ce projet de 5 ans.

Raffiner : Pour définir les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons établi une grille d'évaluation clinique et de surveillance. Pour réduire au maximum les conséquences de ces

dommages, nous mettrons en œuvre les moyens suivants : enrichissement de l'environnement, soins pré, per et post-opératoires, administration d'analgésiques, manipulation quotidienne après l'intervention chirurgicale, phases d'habituation aux tests comportementaux, manipulation et examen biquotidiens avant et après la session comportementale, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt. L'état de santé et l'attitude générale des animaux seront donc évalués individuellement 2 fois par jour. L'animal sera pesé une fois par semaine.

12851 Ce projet a comme objectif d'évaluer l'impact d'une exposition aux mycotoxines avec ou sans additif alimentaire (à base de microorganismes vivants ou de fractions microbiennes) sur la réponse immunitaire du jeune bovin pendant les dernières semaines d'allaitement et après sevrage. Dans ce travail, nous évaluerons également les effets sur le microbiote ruminal dont le rôle modulateur du système immunitaire a été souligné.

La règle des 3R a été prise en compte durant toute la durée d'élaboration du projet.

Remplacer : il n'est pas possible de remplacer l'animal dans cette étude car il n'existe pas de méthode alternative fiable pour valider nos objectifs scientifiques.

Réduire : les effectifs animaux ont été limités au maximum tout en permettant d'obtenir des résultats fiables. En raison de l'absence de données concernant les effets des mycotoxines sur le système immunitaire, 2 essais méthodologiques seront réalisés sur un effectif réduit d'animaux pour des mises au point de culture d'explants (n=8) et des indicateurs d'exposition (n=10).

Raffiner : Tous signes de souffrance, abatement, refus de s'alimenter et/ou comportement anormal de l'animal seront signalés immédiatement et évalués pour un éventuel arrêt de l'expérimentation ou sortie pour un individu. La surveillance de la santé des animaux sera quotidienne.

12852 L'infarctus du myocarde est une des premières causes de décès dans le monde. Sa prise en charge consiste en la reperfusion des artères obstruées. Une reperfusion précoce permet de diminuer la taille de l'infarctus et augmente considérablement la survie des patients atteints. Cependant, cette phase de reperfusion est elle-même à l'origine de lésions délétères, dites lésions de reperfusion. Les stratégies de cardioprotection visent à limiter la formation de ces lésions additionnelles pour diminuer de façon encore plus importante la taille de l'infarctus. Notre équipe s'intéresse particulièrement à l'utilisation de certains anti thrombotiques au moment de la reperfusion. En effet, un des mécanismes mis en jeu dans la formation des lésions de reperfusion est l'activation de la coagulation. La formation de caillots est également en lien avec des phénomènes inflammatoires par le biais d'enzymes impliquées dans la cascade de la coagulation (sérines protéases), capables d'activer des récepteurs générant des effets pro-inflammatoires. Ces liens entre inflammation et coagulation jouent un rôle important dans la formation des lésions de reperfusion. Ainsi, l'inhibition des sérines-protéases de la coagulation semble être une stratégie pertinente pour limiter les effets néfastes de la reperfusion. Le fondaparinux et le rivaroxaban sont deux molécules anticoagulantes, inhibant une sérine protéase de la coagulation, le facteur Xa. Notre équipe a déjà montré que le fondaparinux possédait un effet cardioprotecteur dans l'ischémie-reperfusion myocardique chez le rat et que cet effet était en lien avec l'activation précoce d'une voie de survie cellulaire (la voie SAFE). Nous souhaitons étudier si le rivaroxaban possède également un effet cardioprotecteur dans un modèle d'ischémie reperfusion myocardique aigu et en préciser le mécanisme. Nous voulons également préciser le mécanisme à l'origine de l'effet cardioprotecteur des anticoagulants, en étudiant s'ils ont un effet anti-inflammatoire et/ou protecteur de l'endothélium. Nous souhaitons ensuite étudier l'effet d'un traitement chronique du rivaroxaban couplé à un traitement aigu dans un modèle d'ischémie reperfusion avec une durée de reperfusion beaucoup plus longue (8 semaines) afin d'évaluer l'impact du traitement sur le remodelage et l'inflammation post infarctus. Enfin, une dernière partie examinera in vitro sur cardiomyocytes isolés de cœur de rats, la viabilité cellulaire après hypoxie/réoxygénation en présence de rivaroxaban. Les animaux utilisés seront des rats Sprague-Dawley.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : L'expérimentation animale est indispensable pour étudier les lésions d'ischémie-reperfusion myocardique, du fait de l'importance de la circulation sanguine dans les différents mécanismes impliqués.

Réduire : Seules les expériences indispensables seront réalisées. Il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. Les prélèvements d'organes seront optimisés afin de ne pas augmenter le nombre d'animaux nécessaires. Le nombre d'animaux requis pour ce projet est de 350.

Raffiner : Tous les animaux bénéficieront d'une analgésie et d'une anesthésie au cours des procédures chirurgicales, ainsi que d'une analgésie dans les suites opératoires.

12853 Nous voulons comprendre le rôle d'une hormone, l'apeline dont l'expression est augmentée au cours du développement de certains cancers. Le récepteur de l'apeline, APJ est présent à la surface cellulaire, est aussi augmentée dans certains cancers. En 2013, un nouveau ligand de ce récepteur a été identifié: elabela. Tout comme l'apeline, elabela est une hormone très fortement conservée au cours de l'évolution.

Les hormones apeline et elabela sont produites sous forme de protéines qui peuvent être modifiées par coupure réalisée par la furine. Notre but est d'évaluer le rôle du clivage de l'apeline et d'elabela lors de la maturation par la furine dans l'inhibition de la progression tumorale in vivo. Le modèle de la souris est le plus adapté à notre projet de recherche car nous avons différents modèles de tumeurs induites chez la souris se comportant comme des tumeurs humaines dans un contexte immunitaire fonctionnel. De plus l'apeline et elabela sont identiques chez la souris et chez l'homme. Et enfin, des souris déficientes en récepteur apj ou en hormone apeline sont élevées au sein de l'animalerie et, tout en veillant à limiter le nombre d'animaux impliqués dans ce projet de recherche, ces lignées nous permettront de confirmer et d'évaluer les effets réels de nos molécules sur la croissance tumorale, la formation de métastases et l'angiogenèse (modèle d'angiogenèse rétinienne). Les résultats obtenus permettront d'avoir des informations préalables et précieuses à l'élaboration d'essais cliniques qui à plus long terme pourraient avoir une finalité chez l'homme.

Dans ce contexte, nous veillerons à respecter la règle des 3R:

-Remplacer: divers tests sur des cellules tumorales et des cellules endothéliales en culture in vitro nous ont déjà permis de déterminer certains effets de nos molécules. Cependant, l'utilisation de modèles in vivo comme la souris est indispensable à la compréhension des mécanismes d'action de ces molécules dans un organisme entier proche de l'homme, incluant des paramètres comme le développement tumoral, le microenvironnement, les contraintes physiques etc. qui ne sont pas retrouvés in vitro. Cette étape est également nécessaire puisque nous envisageons une potentielle et future utilisation chez l'homme comme thérapie. Nous utiliserons plusieurs souches de souris : les souris Ragy2C-/-, les souris BALB/c, les souris transgéniques (APJ+/-, APJWT, Apeline KO et Apeline WT) C57BL/6J et les souris NMRI.

-Réduire: afin de limiter au maximum le nombre d'animaux, nous utiliserons les mêmes souris contrôles pour tester dans une même expérience les hormones : apeline, elabela ainsi que leurs mutants. Cette association nous permet de diviser par deux le nombre de souris contrôles. Le nombre d'animaux par lot sera également réduit au maximum afin d'avoir des résultats statistiquement significatifs (lots de 7 animaux par condition). Ce projet nécessite 3009 animaux.

-Raffiner: le bien-être de l'animal au quotidien est nécessaire au bon déroulement de nos expériences, mais également à la reproductibilité de nos résultats. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt. Au cours de nos expériences, de la nourriture humidifiée sera accessible directement dans la cage pour éviter la déshydratation des souris après la chirurgie. Des tapis chauffants seront également utilisés lors de l'anesthésie des souris, pendant l'opération, et lors de la phase de réveil. Des injections sous-cutanées d'analgésique pré et postopératoire pourront être réalisées en fonction de l'expérience et de la souffrance de l'animal (buprénorphine). Des enrichissements (tunnels polycarbonate) sont présents dans les cages. Un suivi attentif par du personnel compétent et formé, weekend compris, sera également mis en place. Au moindre doute, nous ferons appel aux conseils de notre vétérinaire ou de la Structure du Bien-Etre Animal (SBEA).

12854 D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, le cancer est une cause majeure de décès dans le monde, avec 8,8 millions de décès en 2015. Après celui du poumon, le cancer du foie est le plus meurtrier causant 788 000 décès dans le monde et 8000 décès en France par an.

Le choix du traitement de ce cancer dépend du stade d'avancée de la maladie. La transplantation hépatique, la résection chirurgicale ou la destruction percutanée sont les traitements pour un cancer diagnostiqué à un stade peu avancé. La chimioembolisation, la chimiothérapie, les thérapies ciblées, les traitements palliatifs sont proposés dans le cas de cancers plus avancés.

La destruction percutanée est envisagée chez les patients ayant de petites tumeurs. Ce traitement peu invasif est une alternative à la chirurgie consistant à introduire une sonde au niveau de l'abdomen pour atteindre la tumeur et la détruire par la chaleur. Ce traitement est rapide avec peu de complications reportées. L'insertion de la sonde peut être réalisée manuellement ou à l'aide d'une plateforme robotique.

L'objectif est de développer une nouvelle technologie robotisée permettant la réalisation de biopsies et la destruction percutanée mini-invasive de tumeurs localisées dans l'abdomen. Cette plateforme robotisée propose une atteinte très précise et sécurisée des tumeurs. Elle sera une alternative pour les patients n'ayant pas recours à la transplantation ou aux traitements par chimiothérapie ou radiologie.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Des tests in-vitro ont été réalisés afin de s'assurer du bon fonctionnement du robot. Néanmoins, il est nécessaire d'évaluer l'efficacité et la sécurité de la plateforme robotisée en réalisant des tests sur animaux pour prendre en compte les éléments qui ne peuvent pas être démontrés par des tests in-vitro (mouvements naturels engendrés par la respiration, proximité d'autres organes et des vaisseaux sanguins).

Réduire : Le porc est choisi car son anatomie, notamment la taille de ses organes, se rapproche le plus de l'Homme. L'objectif de notre plateforme robotique est d'atteindre très précisément les tumeurs afin de s'assurer qu'elles seront bien détruites en limitant la destruction de cellules saines. Plusieurs tumeurs seront simulées chez un même animal afin de pouvoir vérifier la précision d'atteinte de la zone à détruire, tout en limitant au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Sur 5 ans, nous utiliserons un maximum 30 porcs au total. Pour chaque essai, le nombre d'animaux est calculé afin d'utiliser le minimum nécessaire pour obtenir les informations qui permettront de passer en toute sécurité en phase clinique.

Raffiner : Les porcs étant des animaux sociaux, ils seront hébergés en groupe. Si pour les besoins de l'étude, ils sont amenés à être individualisés, alors ils auront un contact visuel et olfactif et un accès à un enrichissement spécifique à leur espèce. Des interactions quotidiennes avec du personnel formé pour cette espèce animale seront mises en place. Des points limites, suffisamment prédictifs, permettront de sortir un animal de l'étude afin de limiter la douleur à son minimum.

12855 Ce projet de recherche vise à déterminer si l'activation au cours du sommeil paradoxal du noyau supramammillaire est importante pour la mémoire.

Occupant un tiers de notre vie, le sommeil est un besoin vital à notre bien-être et nos capacités mentales. Il s'organise en deux états distincts. Le premier, caractérisé par des oscillations corticales lentes sur l'électroencéphalogramme, est appelé sommeil lent et se distingue qualitativement d'un autre état dont l'activité cérébrale est similaire à celle de l'éveil mais pendant lequel l'activité motrice est abolie. Ce sommeil paradoxal est le principal siège de l'activité onirique qui a souvent un fort contenu émotionnel. Il jouerait un rôle clef dans la mémorisation de souvenirs importants, plus particulièrement ceux contenant un élément émotionnel. En effet, les événements importants de notre vie, qu'ils soient plaisants ou aversifs, sont souvent chargés d'une forte valence émotionnelle.

Cette étude vise à tester chez la souris l'hypothèse que les effets bénéfiques du sommeil paradoxal sur la mémoire émotionnelle sont dus au recrutement de neurones glutamate/GABA du noyau supramammillaire de l'hypothalamus. Ces neurones sont connectés à l'hippocampe, une structure cérébrale clef dans les processus d'apprentissage et de mémorisation émotionnelle.

Expérimentalement, des souris seront à une semaine d'intervalle soumises à un test de mémoire spatiale et un test d'apprentissage associatif simple. Puis pendant les périodes de sommeil paradoxal post-apprentissage, l'activité électrique des neurones glutamate/GABA du noyau supramammillaire sera inhibée par différentes approches génétiques complémentaires. Si notre hypothèse de travail est valide, ce protocole devrait perturber la consolidation et la mémorisation des deux apprentissages. Ces travaux permettront d'accroître nos connaissances sur l'impact du sommeil sur nos capacités de mémorisation et d'apprentissage. L'étude prévoit l'utilisation sur 5 ans de 160 souris mâles adultes de type transgénique de la lignée Sum-cre réparties en 5 lots expérimentaux pour trois procédures expérimentales. Toutes seront mises à mort à la fin de chacune des procédures (d'une durée de 5 semaines) pour des analyses post-mortem des cerveaux. Un effort sera porté pour répondre explicitement aux principes et exigences des 3R:

Remplacer: Le sommeil paradoxal est un état de vigilance spécifique aux mammifères. Son étude ne peut être conduite sur des animaux de niveau phylogénétique inférieur (mouche, poisson rouge, c-elegans) parfois utilisés en recherche expérimentale. La neuroimagerie humaine, la modélisation *in silico* ou les cultures cellulaires ne constituent pas encore d'alternatives crédibles au modèle rongeur (la souris) pour l'étude de mécanismes cellulaires, synaptiques et moléculaires au sein du cerveau endormi et sous-jacents des fonctions cognitives comme la mémoire et l'apprentissage. C'est pourquoi nous profiterons des avantages que procure l'utilisation de souris de type transgénique qui, combinées aux nouveaux outils génétiques et moléculaires (optogénétique et chémogénétique), permet d'atteindre *in-vivo* des échelles d'analyse fines (de l'ordre de la milliseconde et du micromètre) de ces processus neurobiologiques complexes. Enfin, les réseaux neuronaux que nous cibons sont communs aux mammifères incluant l'homme.

Réduire: La petite taille des lots a été calculée à partir de nos travaux publiés utilisant les mêmes outils (optogénétique, chémogénétique et tests comportementaux) dans le but de générer des données reproductibles dont la significativité sera validée par les tests statistiques adaptés (petits échantillons). Elle tient donc compte des « erreurs et échecs » (20-30%) qui peuvent survenir à chaque étape de chaque procédure expérimentale depuis la préparation des animaux sous anesthésie, lors des tests expérimentaux pour lesquels tous les individus ne répondent pas de manière satisfaisante et doivent être retirés de l'étude jusqu'à la préparation des tissus pour les analyses post-mortem. Chaque animal ne sera soumis qu'à une seule procédure expérimentale avec la mise à mort requise pour les analyses du cerveau, éliminant toute possibilité de réutilisation et requérant donc des lots expérimentaux contrôles.

Raffiner: De par notre expérience d'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques, nous sommes conscients que l'étude du sommeil et de la mémoire émotionnelle requiert que les individus soient constamment placés dans les meilleures conditions psycho-physiologiques. Les conditions d'élevage, de soins post-opératoires, d'hébergement et les différentes étapes de chacune des trois procédures expérimentales sont d'ores et déjà maîtrisées. Les expérimentations seront réalisées par des personnels compétents, formés et suivis dans leur carrière dans le cadre de leur formation continue à l'expérimentation animale. Nous avons prévu des procédures appropriées de récupération de la chirurgie implantatoire sous anesthésie puis d'habituation aux conditions d'enregistrement dans le but de réduire au maximum le stress et l'inconfort. La sévérité des procédures mises en œuvre est considérée comme modérée car *a priori* sans impact négatif notable sur le confort et bien-être quotidien des animaux, à l'exception de légers stress transitoires lors des manipulations inhérentes à la chirurgie sous anesthésie générale et aux tests comportementaux. Des perturbations mnésiques transitoires seront également attendues en réponse aux protocoles d'inhibition du noyau supramammillaire, qui constituent l'essence de ce projet expérimental. Par précaution, nous avons fixé des critères d'interruption des expérimentations et d'exclusion (douleur, souffrance physique et psychique, agressivité, perte de poids) estimés grâce à une grille d'évaluation quotidienne, leur impact étant manifestement délétère sur le sommeil (insomnie, fragmentation du sommeil) et sur les capacités d'apprentissage et de mémorisation.

12856 L'utilisation des pesticides conventionnels est de plus en plus controversée à cause des effets sur l'environnement et la santé humaine. Pour cela, l'opinion publique et les gouvernements

encouragent la réduction de leur usage. Cependant, en raison de l'accroissement de la population mondiale, une solution aux problèmes des pesticides se doit d'être trouvée afin de pouvoir produire assez de nourritures pour nourrir une population toujours croissante, d'où l'émergence de l'usage de biopesticides.

Parmi ces biopesticides, les plus utilisés sont les bioinsecticides Bt (*Bacillus thuringiensis*, bactérie du groupe *Bacillus cereus* sensu lato). Ces bioinsecticides ciblent les larves d'insectes ravageurs grâce à la présence de toxines spécifiques qui vont détruire l'épithélium intestinal et entraîner septicémie et mort de l'insecte. Parmi les 4 souches de Bt utilisées commercialement, la souche Bt var. *kurstaki* (Btk) est le bioinsecticide le plus largement utilisé en agriculture biologique.

L'utilisation massive et la dispersion croissante dans l'environnement des bioinsecticides Btk posent la question de leur impact potentiel sur la santé et sur l'environnement, d'autant plus qu'il y a une absence de données sur les risques sanitaires liés à la présence de Bt dans les produits alimentaires. Cette observation est à rapprocher du fait que Bt est génétiquement très proche de la souche pathogène opportuniste *B. cereus*, 3^{ème} cause d'intoxications alimentaires dans le monde après *Salmonella* spp et *Staphylococcus aureus*. Cependant, de récentes analyses plus poussées de plusieurs cas d'intoxications d'abord attribuées à *B. cereus* ont mis en évidence que certains étaient dus à la présence de Bt, les méthodes standards de détection et d'énumération de *B. cereus* ne permettant pas de différencier *B. cereus* de *B. thuringiensis*. Dans ces conditions, la responsabilité de Bt dans les intoxications est sans doute largement sous-estimée.

Ce projet devrait permettre de répondre à la question de l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA) et de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (ANSES) sur les risques de santé publique liés à la présence de bactéries du groupe *B. cereus* sensu lato, parmi lesquelles *B. thuringiensis*, dans l'alimentation (EFSA-Q-2015-00254 ; ANSES, Saisine n° 2013-SA-0039).

Pour répondre à cette question, nous utiliserons 1344 souris pour tester les effets sur ces animaux de 8 souches de *B. cereus* et de *B. thuringiensis* administrées par voie orale, ou par voie intraveineuse afin de mimer la bactériémie induite par ces bactéries. Dans un souci de remplacement et de réduction, des expériences préliminaires sont en cours sur des macrophages, ainsi que dans un modèle de *Drosophile*, infectés avec une collection de souches de *Bacillus* afin d'identifier les souches d'intérêt qui seront alors testées chez la souris. En termes de raffinement, les souris seront hébergées dans un environnement enrichi. Après infection les animaux seront surveillés quotidiennement par le personnel animalier et les responsables du projet.

Notre expérience d'infection sur le modèle utilisé nous a permis de constater qu'il n'y avait pas de souffrance apparente chez les animaux suite à l'infection et durant la durée de l'expérience. Nous considérerons cependant les critères d'appréciation de la douleur selon une grille de score. En cas d'apparition de ces signes de souffrance, l'animal sera tout particulièrement surveillé. Si ceux-ci persistent plus de 24h, les animaux concernés seront euthanasiés.

12857 Le but de ce projet est de développer des protocoles de mesures de comportement en utilisant des cages spéciales. Il s'agit d'un système permettant l'évaluation de différents comportements en situation sociale dans laquelle les animaux sont groupés. Chaque cage (20 x 55 x 38 cm) est équipée aux 4 coins par un tunnel et un système opérant avec des détecteurs de présence (présence de l'animal et une antenne d'identification de la puce), des détecteurs de contact du museau appelés également « nosepokes » et deux portes motorisées donnant accès chacune à un biberon. Un jet d'air peut également être envoyé. Nous projetons de faire différentes expériences de mesures de comportement, incluant la préférence pour une solution sucrée, la hiérarchie de groupe, un apprentissage spatial.

Respect de la règle des 3R

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

majeure partie des études sont faites sur des animaux isolés car les équipements expérimentaux ne permettent pas de mesurer en situation de groupe. Ce projet permet d'avoir des mesures de comportement en situation sociale (en groupe).

Réduire : Nous utiliserons 96 souris en tout (24 animaux par sexe et par lignée, 2 lignées), un effectif approprié pour les études comportementales et pour établir des données de référence dans ce système, et suffisant pour montrer une différence statistique entre les groupes expérimentaux, si elle existe. Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés, les différents tests seront réalisés sur les mêmes animaux.

Raffiner : Aucune douleur majeure n'est attendue. La pose de puces d'identification sera faite sous anesthésie gazeuse, et lors de cette pose nous mettrons de la xylocaïne en sous cutanée à 5mg/kg. L'incision générée par l'aiguille d'injection est petite et ne nécessite pas de point de suture. Toutefois, si un point de suture semble nécessaire, il sera fait. La souris est placée sur un tapis chauffant à 37°C et est surveillée jusqu'à son réveil. Les souris bénéficieront d'un suivi quotidien et si un animal présente des signes de douleur ou de mal-être, il sera écarté des tests et sera traité de manière à soulager ou guérir son état.

Nous allons mettre au point et utiliser un nouveau dispositif de phénotypage comportemental, le système IntelliCage, qui permet de réaliser des études longitudinales (au fil de l'âge) des capacités cognitives chez les rongeurs en habitat social. Grâce à l'automatisation, une intervention de l'expérimentateur est minimale, ce qui permet une réduction importante du stress chez les animaux au cours du test. La mise au point du système est importante, car certains protocoles utilisant le système IntelliCage peuvent servir comme un raffinement des tests déjà existants. Les personnes impliquées dans ces expériences sont formées au travail avec les rongeurs, et connaissent très bien les règles et appliquent les recommandations éthiques pour respecter le bien-être animal.

12858 Les cancers urologiques (rein, prostate, vessie) représentent 20% des cancers, pratiquement 15% des décès liés au cancer et sont en progression constante. Aux stades avancés, ils sont réfractaires à toutes thérapies malgré le développement des thérapies ciblées. De nouvelles options thérapeutiques doivent donc être impérativement développées. Les tumeurs urologiques se caractérisent par une grande variabilité entre les individus et sont très hétérogènes. Or, jusqu'à présent, les modèles d'étude préclinique se basent sur les lignées cancéreuses qui ne reflètent pas cette hétérogénéité. Ainsi, malgré le développement de cultures 3D dont la mise en œuvre reste difficile, les modèles animaux s'avèrent toujours indispensables. L'approche par xénogreffe, c'est-à-dire une greffe, chez la souris immunodéficiente ou la souris humanisée, de tumeurs humaines directement obtenues à partir de patients au moment de la chirurgie, reproduit fidèlement les caractéristiques des tumeurs humaines et apparaît comme le modèle d'étude le plus pertinent mais est encore très peu répandu dans la sphère urologique. Les implantations seront réalisées sous anesthésie générale et un analgésique sera ajouté dans l'eau de boisson durant trois jours après la chirurgie.

Aussi, l'objectif du projet est la mise en place de xénogreffes tumorales issues de patients pour les cancers urologiques et de proposer ces modèles pour une évaluation fiable de candidats médicaments. Les tumeurs de patients seront dans un premier temps fragmentées et greffées sur 6 animaux, soit en sous-cutané, soit sous la capsule rénale. Puis, les greffes qui auront pris suite à la primo-implantation seront établies grâce à plusieurs passages successifs en sous-cutané, délai pendant lequel la capacité des différents modèles à être congelés sera testée. Enfin, les tumeurs supportant la congélation seront amplifiées pour faire un stock de fragments congelés et pour tester plusieurs molécules de référence. Les tumeurs seront ensuite utilisées pour tester l'efficacité de candidats médicaments. L'ensemble de ces étapes nécessitera l'utilisation de 7350 souris immunodéficientes et de 1000 souris humanisées pour le test de nouvelles immunothérapies.

Respect de la règle des 3R:

Remplacer : Aucune méthode de remplacement n'existe malheureusement à ce jour, comme expliqué précédemment.

Réduire : Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés pour les différentes étapes du développement des xénogreffes tout en créant une banque suffisamment représentative de la diversité de la maladie, en limitant le nombre d'animaux par échantillon prélevé à 6, pour chaque passage et pour les tests de décongélation, et à 10 par groupe pour les tests d'efficacité anti-tumorale de molécules de référence et de candidats médicaments, nombre minimum pour avoir des résultats statistiques.

Raffiner : Le raffinement sera assuré par différents types d'enrichissement (matériel pour nidification, objet à ronger, objet pour se cacher). Les souris seront nourries ad libitum et hébergées en groupe ; elles ne seront séparées qu'en cas de comportement agressif. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours. De plus, nous avons établi des points limites qui mettront fin à l'expérimentation si nécessaire :

- altération des fonctions normales (impossibilité d'uriner, de se nourrir, de s'alimenter...),
- présence d'une souffrance/douleur (vocalisation, perte d'appétit, poil hérissé, prostration...),
- une perte de poids $\geq 20\%$ du poids initial sur 24h,
- une ulcération tumorale,
- un volume tumoral excédant 10% du poids de l'animal correspondant typiquement à un volume de 2500 mm³ pour une souris de 25 g.

12859 Notre laboratoire étudie depuis de nombreuses années les régulateurs de l'angiogenèse et de l'invasion sur des modèles cellulaires in vitro. L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins, intervenant dans des étapes du développement tumoral pour assurer la croissance et l'irrigation des tumeurs in vivo. Les cellules tumorales acquièrent aussi des propriétés invasives et quittent la tumeur primaire, notamment après des traitements anti-angiogéniques. Ce processus est problématique d'un point de vue clinique dans le cas du glioblastome, un cancer du système nerveux central, car il est impossible d'avoir accès aux cellules invasives afin de circonscrire la tumeur. Aussi, après de nombreuses expériences préliminaires in vitro, nous devons valider nos modèles sur un minimum d'animaux in vivo pour tenir compte du contexte physiologique.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Le contexte physiologique ne peut pas être remplacé par des expériences in vitro. Nous avons caractérisé in vitro l'implication d'une protéine (PRL2) dans l'invasion. La forte expression de cette protéine est également un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de glioblastome. Aussi nous devons maintenant passer à un modèle in vivo chez l'animal pour tester cette hypothèse et évaluer le rôle de cette protéine d'intérêt dans l'évolution de cette maladie afin de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour cela, nous utiliserons 3 souches de souris : une souche immunodéficiente afin d'implanter des cellules tumorales humaines et 2 souches immunocompétentes afin d'implanter des cellules tumorales murines.

Réduire : Nous utiliserons le minimum nécessaire d'animaux pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochables. L'ensemble des expériences impliquera différents lots d'animaux, dont le total sera de 576. Les animaux sont produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être. En effet, afin de réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons tous les mâles et toutes les femelles issus des croisements. Raffiner : Aussi, des mesures seront mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales (anesthésie et analgésie pendant/après la procédure, points limites adaptés pour prévenir la douleur, détresse).

12860 L'ischémie reperfusion (IR) rénale se caractérise par une interruption du flux sanguin au niveau rénal puis une reperfusion. Ce phénomène peut se présenter en clinique lors d'un infarctus du myocarde, d'une insuffisance rénale, d'une occlusion ou d'une obstruction des vaisseaux rénaux, d'un choc septique ou pendant une chirurgie vasculaire. De récentes études épidémiologiques ont démontré que l'IR représente une cause importante d'insuffisance rénale, condition clinique associée à une haute mortalité chez l'homme. A l'heure actuelle, il n'existe pas de thérapie efficace

pour prévenir ou traiter la perte de fonction et les dommages rénaux post-ischémiques, mise à part la thérapie de remplacement d'organe (dialyse ou transplantation). Pour cette raison, l'efficacité des traitements préventifs et des traitements de suppléance restent un enjeu majeur pour la recherche pharmacologique. Le modèle d'ischémie reperfusion bilatérale chez le rongeur est actuellement le plus utilisé puisqu'il est considéré comme le modèle le plus pertinent par rapport aux conditions cliniques où les deux reins sont atteints par l'hypoperfusion sanguine.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de molécules de référence et/ou candidat médicaments sur la perte de fonction et sur les dommages rénaux post-ischémiques en clinique.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Actuellement, les méthodes alternatives permettant une telle évaluation sont inexistantes. De ce fait, ce déficit rend incontournable le recours à l'expérimentation animale afin de valider de nouveaux candidats médicaments sur la perte de fonction et sur les dommages rénaux post-ischémiques en clinique.

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 1200 rats et 1500 souris à raison de 12 à 15 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs). Le nombre de groupes sera fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

Raffiner : Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés selon les recommandations de la directive européenne avec un enrichissement de leur hébergement (morceau de bois, tunnel, carré de coton) permettant de les stimuler. En accord avec la règle de raffinement, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante. Des points limites précoces et des critères d'arrêt seront appliqués.

12861 La consommation de poisson est recommandée pour la santé. En effet, le poisson apporte des acides gras oméga-3 dont on connaît les effets bénéfiques sur le fonctionnement du cœur et du cerveau. Le poisson issu de l'aquaculture est riche en ces acides gras oméga-3 car son alimentation comporte de la farine et de l'huile de poisson, produits très riches en acides gras oméga-3 que sont l'EPA et le DHA. Afin de préserver les ressources marines, la tendance actuelle est au remplacement de la farine et de l'huile de poisson par des végétaux. Cependant, cette substitution non seulement diminue la quantité d'acides gras oméga-3 dans la chair du poisson mais aussi réduit les performances de croissance des poissons. Cette croissance plus faible serait due à une diminution de la prise alimentaire des poissons. En raison du rôle des acides gras oméga-3 sur le fonctionnement du cerveau, cette baisse de l'ingestion pourrait être une conséquence de la suppression des farines et des huiles de poissons et donc des acides gras oméga-3 dans les aliments des poissons. L'objectif de cette expérimentation est donc d'évaluer si la présence d'acides gras oméga-3 dans les aliments influence la prise alimentaire des poissons et donc à terme leur croissance. Aussi, chez le mammifère, le système nerveux central est l'organe qui joue un rôle primordial dans le contrôle central de la prise alimentaire. Ainsi, les enjeux scientifiques de cette expérimentation ont pour but de comprendre l'impact des omégas-3 (DHA et EPA) sur les performances alimentaires de la truite d'élevage (prise alimentaire) puis de caractériser les mécanismes cérébraux qui sont mis en jeu par ces acides gras oméga-3. Pour cela, une expérience d'alimentation sera réalisée sur des truites arc-en-ciel mâles et femelles d'un poids initial d'environ 60 grammes. Les truites seront réparties dans 9 bassins de 150L selon une densité de 21 truites par bassin. Le total des animaux qui sera utilisé durant l'expérimentation s'élève à 189. L'expérience dure 10 semaines et comporte 3 aliments différents. Ainsi 3 bassins recevront un aliment pauvre en DHA/EPA (0% des acides gras totaux), 3 autres, un aliment moyennement riche en DHA/EPA (15% des acides gras totaux) et les 3 bassins restants, un aliment riche en DHA/EPA (30% des acides gras totaux). Dans le but de favoriser le bien-être et de minimiser au maximum le stress de l'animal, l'expérience sera réalisée dans des conditions d'élevage dite classiques et les truites seront élevées dès leur premier repas sur le site de l'expérimentation avant d'atteindre le poids initial de l'expérience. Les conditions d'élevage seront optimisées : la température sera de 17°C (+/- 1°C), les animaux seront placés en bassins extérieurs et soumis à une photopériode naturelle, l'eau sera

saturée en oxygène à 100% et les bacs seront constamment renouvelés en eau de rivière (6 fois par heure). La densité d'animaux par bac à la fin d'expérience devrait être de 22kg/m³ soit une densité en dessous du maximum physiologique accepté en élevage (30kg/m³). Il a été démontré précédemment que l'ensemble de ces dispositions expérimentales ne stresse pas les animaux et permet ainsi le bon déroulement d'une expérimentation nutritionnelle. Les 3 régimes seront testés sur des bacs en triplicata pour s'assurer de la fiabilité des résultats obtenus. Les animaux seront nourris à la main 2 fois par jour par le même expérimentateur (entre 8h30 et 9h00 puis entre 16h30 et 17h00). Les animaux seront pesés au début et à la fin de l'expérience afin d'éviter des manipulations potentiellement génératrices de stress pour les animaux. A la fin de l'expérience, les animaux seront anesthésiés puis euthanasiés et leurs cerveaux seront prélevés dans le but de réaliser des analyses biochimiques visant à déterminer le taux d'incorporation des lipides dans le cerveau ainsi que des analyses moléculaires d'expression de gènes dans différentes zones cérébrales afin de caractériser l'impact des acides gras oméga-3 sur la prise alimentaire et la croissance. Dans le cadre de la règle des 3 R, soulignons que :

- Le remplacement n'a pas été possible, car l'étude des effets d'un régime alimentaire chez un animal ne peut pas se faire in vitro ou par des systèmes de mesures informatiques.
- La réduction a été un objectif réel, le nombre de poissons prélevés est calculé à minima, compte tenu de la variabilité individuelle observée dans des analyses antérieures
- Le raffinement a été respecté car aucun prélèvement ne se fera sur animaux vivants et aucune manipulation aura lieu durant la période d'alimentation diminuant ainsi les contraintes que pourrait subir un animal en bassin d'élevage (stress, douleurs, anxiété). Aussi les conditions d'élevage pendant l'expérience seront optimisées. Enfin, la mise à mort sera réalisée successivement par bain anesthésiant de benzocaïne puis bain euthanasiant dans le but de diminuer au maximum les contraintes (stress et anxiété) de l'animal durant cette période..

12862 Les troubles du spectre autistique (TSA) forment un groupe de pathologies, d'origine neurodéveloppementale, qui touchent environ 1 enfants sur 70. Cette condition pose un fort défi pour les enfants (ainsi que pour les familles des enfants) atteints de cette pathologie. À ce jour, il n'existe aucun traitement pharmacologique ciblé approuvé par l'Agence Européenne des Médicaments pour améliorer la vie des individus touchés par cette maladie. Notre travail repose sur l'étude d'une forme génétique de TSA, qui est très bien caractérisée et pour laquelle plusieurs traitements expérimentaux ont été développés grâce aux études effectuées sur le modèle murin de cette pathologie. L'objectif de notre projet est d'étudier les conséquences sur le fonctionnement du cerveau, d'un traitement chronique avec deux molécules expérimentales. Notre stratégie expérimentale implique l'administration quotidienne de la molécule (à partir du sevrage et jusqu'à l'âge adulte), suivie par les tests servant à évaluer les conséquences du traitement sur le réseau neuronal (par exemple : en évaluant son effet sur la communication entre des différentes aires cérébrales). Ce type de mesures, servant à évaluer les altérations au niveau de la connectivité du cerveau, a été choisi en cohérence avec les mesures de connectivité chez l'homme (exemple : les tests par l'imagerie à résonance magnétique (IRM) ou l'électroencéphalogramme (EEG)). Les approches mises en œuvre sont soit une chirurgie peu douloureuse, soit une séance d'imagerie par IRM sous anesthésie, soit les tests de comportement impliquant un stress transitoire. Les bénéfices attendus de notre travail sont une meilleure compréhension des effets d'un traitement expérimental chronique, et à long terme, la définition des mesures biologiques, qui aident à l'évaluation thérapeutique d'une molécule expérimentale dans une population fragile.

Respect du principe des 3R :

Remplacer : notre projet porte sur l'étude de la connectivité neuronale, en cohérence avec les études menées chez l'homme, et nécessite donc l'utilisation de systèmes complexes et entiers. Pour ces raisons, le remplacement avec les animaux de plus faible sensibilité, ou par les méthodes in vitro ou in silico n'est pas possible à ce jour.

Réduire : nous avons réfléchi aux expériences de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaire à l'exploitation statistique des résultats. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire pour la réalisation de ce projet crucial à 544 animaux.

Raffiner: Les animaux sont hébergés de manière adaptée à leurs besoins et reçoivent une surveillance quotidienne et les soins adaptés (anesthésie, analgésie, stratégie pour éviter la déshydratation ou l'hypothermie ; surveillances des signes cliniques). Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12863 Les lipides sont présents en quantité importante dans l'alimentation des pays occidentaux, et contiennent généralement des acides gras à longues chaînes (entre 16 et 24 carbones) qui sont le plus souvent saturés. Lorsque ces lipides saturés sont consommés de façon concomitante avec des sucres raffinés, ils sont très efficacement mis sous forme de réserve dans les adipocytes, mécanisme à l'origine d'une prise de poids importante, menant à des problèmes d'obésité et au développement des maladies métaboliques (diabète de type 2, etc...). Il existe également des acides gras à chaîne moyenne (MCFAs, entre 8 et 10 carbones : C8–C10) qui semblent au contraire diminuer la prise de poids. Des études réalisées chez l'homme et sur des rongeurs ont montré que ces MCFAs induisent une augmentation de la dépense énergétique et une augmentation de l'oxydation des lipides comparativement à l'utilisation des acides gras à longue chaîne. Il s'en suit une perte de masse grasseuse. Chez le rat, il a été montré que la vitesse d'oxydation des MCFAs est plus rapide que celle des acides gras à longues chaînes et ceci dans tous les tissus. Dans plusieurs études, l'administration chronique de ces MCFAs améliore la capacité d'endurance des animaux, ainsi que chez l'homme. La prise de ces acides gras entraîne également une augmentation de la présence de corps cétoniques au niveau circulant. Néanmoins, les effets de ces acides gras sur le métabolisme du muscle squelettique ainsi que sur les aspects moléculaires restent mal connus.

Dans le cadre de l'étude des lipides, nous nous proposons d'étudier les effets bénéfiques du régime alimentaire de type cétogène. Ce type de régime exclut pratiquement les glucides pour favoriser une alimentation très riche en lipides et en protéines. L'organisme tire alors sa source d'énergie de la dégradation des lipides qui génère une production de corps cétoniques au niveau du foie. C'est un régime thérapeutique très strict et rigoureusement calculé, que l'on utilise donc pour créer une cétose tout en gardant un apport énergétique suffisant. Ce n'est plus le glucose qui fournit l'énergie aux différentes cellules, mais les corps cétoniques (d'où le terme de « cétose »). Ces corps cétoniques sont augmentés de façon très importante lors de périodes de jeun prolongé, ils permettent d'apporter de l'énergie notamment au cerveau, lorsque les réserves en glucose diminuent. On dispose de plus en plus de données prouvant que ces molécules agissent également comme des molécules actives ayant des effets bénéfiques dans différentes pathologies, parmi lesquelles des maladies neurologiques comme l'épilepsie, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, la migraine, les douleurs diffuses et la sclérose en plaques, mais aussi contre des troubles du métabolisme qui affectent une grande partie des pays occidentaux (obésité, syndrome métabolique, diabète), ainsi que contre des processus inflammatoires pathologiques comme l'asthme, l'arthrite, les rhumatismes ou l'hépatite ainsi que le cancer. Les effets bénéfiques de ces molécules de « survie » restent encore imparfaitement connus dans l'ensemble de ces pathologies mais représentent un vaste champ d'investigation.

Nous nous proposons de réaliser plusieurs expériences afin de mettre en évidence :

- 1) Les effets bénéfiques d'un régime enrichi en MCFAs sur les capacités à l'exercice de souris normales ainsi que les adaptations métaboliques (cellulaires et moléculaires) au niveau des muscles squelettiques
- 2) les effets positifs du régime cétogène (enrichi en MCFAs) sur la prise de poids des souris et des symptômes de l'obésité et du développement du syndrome métabolique. Ce régime cétogène sera comparé à un régime enrichi en graisse (High fat diet) inférieur en terme de calorie mais beaucoup plus riche en sucre et qui est bien connu pour provoquer le développement d'un syndrome métabolique et d'une obésité importante.

3) L'effet synergique du régime alimentaire enrichi en MCFAs avec l'entraînement physique spontané des souris. Cela permettra de montrer plus clairement les effets bénéfiques de ces lipides particuliers lorsqu'on réalise des séances d'exercice physique régulièrement (les souris sont capables de courir spontanément plusieurs heures par jour grâce à des roues d'activité placées dans chaque cage individuelle).

Concernant les 3R,

Remplacer : Ce projet « nutrition et santé » ne peut se faire que chez l'animal (souris), afin d'évaluer les capacités à l'exercice, le métabolisme du muscle squelettique ainsi que les variations de poids corporel.

Réduire : Nous utiliserons le minimum d'animaux afin de pouvoir valider nos hypothèses. Le nombre total de souris sera de 135 pour l'ensemble du projet.

Raffiner : Nous diminuerons au maximum les stress que subissent les souris. Pour les tests induisant un inconfort ou un stress, une phase d'habituation sera mise en place pour les minimiser. Ainsi, nous diminuerons au maximum le stress rencontré par les souris au moment de la réalisation de l'épreuve d'effort sur tapis, avec un arrêt de l'épreuve d'effort dès que l'animal montre des signes importants de fatigues. Le bien-être des animaux sera suivi au quotidien, en appliquant les points limites définis et des critères d'arrêt.

Ce projet permettra de mettre clairement en évidence les effets bénéfiques de régimes alimentaires basés sur l'utilisation de lipides à chaînes moyennes avec ou sans glucides (régime cétogène). Ces régimes pourront par la suite être développés chez l'homme. L'étude animale permettant d'une part de valider les effets bénéfiques mais également de montrer les voies de signalisation au niveau cellulaire et moléculaire afin de valider scientifiquement des procédures déjà utilisées de façon empirique chez certains types de patients.

12864 Le marché des produits nano-additivés, c'est-à-dire contenant des matériaux de taille comprise entre 1 et 100 nm, croît de façon soutenue depuis le début des années 2000. Le secteur agricole est concerné, notamment dans le domaine des produits phytosanitaires pour lesquels des produits issus des nanotechnologies sont déjà commercialisés ou bien en cours de développement comme en témoignent les nombreux brevets déjà déposés. L'incorporation de nanomatériaux aux produits utilisés conventionnellement en agriculture vise à améliorer leurs propriétés : une meilleure délivrance des agents actifs, une diminution de la quantité à appliquer, une meilleure gestion de leur devenir dans l'environnement...

Les problématiques sanitaires et environnementales soulevées par l'usage à grande ampleur des nano-objets sont aujourd'hui reconnues dans la communauté scientifique, spécifiquement concernant l'exposition potentielle des populations aux nanomatériaux manufacturés. En effet, ils sont susceptibles d'être disséminés dans l'environnement à cause des activités agricoles, principalement suite à leur remise en suspension dans le compartiment aérien sous forme de particules sous l'action du vent. Or, les travaux déjà menés sur le sujet de la toxicité des nano-objets par inhalation, s'intéressent généralement à la toxicité du nanomatériau seul et non à la toxicité du mélange de celui-ci, lorsqu'il est associé à différents composés au sein d'une formulation commerciale, ce qui occulte les possibles synergies toxiques qui pourraient exister. De plus, les études ne sont que rarement réalisées dans un contexte réaliste d'exposition par voie respiratoire. Ainsi, l'utilisation accrue prévisible de nanomatériaux dans le secteur agricole s'accompagne d'interrogations légitimes des pouvoirs publics et de la population générale quant à leur devenir et leur impact potentiel sur l'environnement et la santé humaine. En conséquence, il est nécessaire de mener des études visant à clarifier ces questions.

Parmi les nombreux types de nano-objets actuellement usités, les nanoparticules de dioxyde de titane (nano-TiO₂) sont parmi les plus employées (plusieurs milliers de tonnes annuellement en France) notamment en raison de leur stabilité, de leur faible coût et de leur facilité de mise en œuvre. Dans le secteur agricole, ces nanoparticules sont étudiées pour un usage comme fertilisant, comme vecteur nanométrique visant à délivrer de façon plus efficace les produits phytosanitaires, comme facteur pouvant dégrader les produits phytosanitaires stables dans l'environnement pour limiter leur

persistance, ou bien encore pour augmenter la durée d'action d'un composé en augmentant sa stabilité.

Ce projet de recherche vise à apporter des connaissances nouvelles concernant l'impact associé à l'inhalation chronique de pesticides nano-additivés sur les fonctions cérébrales, en étudiant chez la souris, les effets à la fois sur le cerveau adulte et sur le cerveau en cours de développement. Il s'appuie sur un dispositif de génération d'aérosols développé ad hoc et dédié à l'étude en toxicologie animale. Ce banc d'exposition, qui a été caractérisé métrologiquement, est élaboré pour permettre à la fois le respect des recommandations en expérimentation animale et les lignes directrices pour l'évaluation sanitaire des produits chimiques. Il propose une étude s'appuyant à la fois sur les nanoparticules de TiO₂, produit emblématique d'usage courant et à la toxicité encore mal comprise, et sur le paraquat, un herbicide connu pour induire des effets neurotoxiques pouvant mener au syndrome parkinsonien. En dehors de ses utilisations commerciales, ce pesticide est utilisé en outre comme modèle pour étudier la maladie de Parkinson, pathologie qui affecte préférentiellement les agriculteurs.

Les principes de remplacement, réduction et raffinement ont été pris en compte pour construire les protocoles expérimentaux de ce projet :

Remplacer : Pour atteindre cet objectif, il n'existe pas d'alternative aux expérimentations in vivo. L'utilisation du modèle animal est incontournable pour pouvoir évaluer l'impact d'une exposition réaliste par voie aérosol sur le fonctionnement cérébral. Ce projet s'appuie sur des expositions réalistes à l'aide d'une enceinte d'exposition par voie aérosol conçue spécialement pour répondre aux exigences de l'expérimentation en animalerie et du respect du bien-être animal. Le plan d'expérience prévoit d'étudier plusieurs fenêtres temporelles jusqu'à 8 semaines d'exposition. Deux lignées de souris seront exposées, une lignée témoin comparativement à une lignée transgénique présentant une prédisposition au développement d'une maladie neurologique.

Réduire : Le nombre minimum de souris nécessaires a été estimé pour pouvoir interpréter statistiquement les résultats. Un total de 708 souris sur les 5 ans permettra d'avoir une bonne représentation statistique.

Raffiner : L'hébergement comme les expositions seront assurés en groupe pour permettre aux animaux d'exprimer un comportement social naturel. L'ensemble des procédures du projet (expositions par voie aérosol dans une enceinte où les animaux sont libres de se mouvoir, tests d'adresse locomotrice) ne comprend pas de procédure a priori douloureuse et seront effectués dans le souci du respect du bien-être animal, sans générer a priori de souffrance ni de stress pour les animaux. Néanmoins, les souris seront examinées avec soin tout au long de l'administration des molécules testées. Des points limites adaptés ont été définis de façon à éviter au mieux toute souffrance inutile.

12865 L'hypertension artérielle (HTA) est la pathologie cardio-vasculaire dont la prévalence est la plus forte dans la population mondiale, selon l'OMS. C'est également un facteur de risque pour le développement d'autres pathologies, comme l'accident vasculaire cérébral (AVC). L'HTA induit à long terme des modifications de la paroi artérielle, induisant une perte de plasticité des vaisseaux, et augmentant le risque de formation de caillot sanguin.

Le système du monoxyde d'azote (NO) est un élément essentiel dans la régulation de la pression artérielle. Le NO régule négativement la contraction des muscles lisses sous endothéliales et participe ainsi à la dilatation des vaisseaux. Des maladies à l'exemple de certaines formes d'artériopathies congénitales provoquent une augmentation de la tension par altération de la voie NO.

Il est difficile de prévenir la survenue d'AVC chez ces patients, car les altérations ne sont pas similaires à celles observées dans le reste de la population. Afin de pouvoir tester de nouveaux traitements préventifs de la survenue d'AVC chez ces patients, un modèle d'étude de développement d'hypertension sur le rat Wistar doit être perfectionné. Il consiste en l'administration d'un inhibiteur de la NO-synthase (L-NAME), induisant une hypertension chronique

chez les rats. Ce traitement est administré dans l'eau de boisson des rats pendant une période de 80 jours.

Un ensemble d'analyses des activités motrices et sensorielles basées sur des scores permettant de révéler avec précision la survenue des troubles liés aux AVC, ainsi que des analyses anatomo-pathologiques, seront réalisés dans le but d'appréhender tous les aspects médicaux de ce modèle. Ce projet permettra de mieux appréhender les mécanismes induisant une altération de la paroi vasculaire, et donc de mieux anticiper la survenue d'AVC avec pour objectif final de tester un traitement préventif des AVC transposable par la suite chez des patients souffrant de pathologie difficilement traitable de nos jours.

Ce projet se déroulera pendant une année et portera sur 65 rats.

Ce projet est construit en intégrant au maximum la préconisation des 3 R : Remplacer et Raffiner les modèles d'études actuels afin de Réduire le nombre d'animaux inclus dans les protocoles expérimentaux. Les procédures expérimentales ont été pensées pour utiliser le moins d'animaux possible. Le remplacement par un modèle non animal n'est pas possible, car les processus au niveau des vaisseaux sanguins mettant en jeu la voie du NO est difficilement exploitable sans avoir recours à l'observation du système cœur vaisseau dans son ensemble. Une étude statistique a été réalisée a priori pour diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés. Ces calculs sont possibles grâce à l'étude des résultats antérieurs avec ces modèles animaux. La gestion de la douleur ou le stress des animaux sont pris en compte, et des points limites ont été définis. Dans le cas où ces points seraient atteints, les animaux seront euthanasiés. Les animaux seront maintenus en cages collectives, équipées d'enrichissement afin d'éviter tout stress supplémentaire et le soin des animaux sera fait par des personnes compétentes et expérimentées.

En fin d'expérience, les animaux traités seront euthanasiés pour effectuer des analyses sur leurs cerveaux et leurs sang.

12866 L'objectif du projet est d'étudier les propriétés des réseaux neuronaux qui assurent l'encodage, le traitement et le stockage des informations dans le cerveau. Cette étude sera réalisée sur des modèles expérimentaux chez le rongeur (rat, souris), mais servira également à mieux comprendre les déficits cognitifs associés aux principales pathologies cérébrales (maladies neurodéveloppementales, neurodégénératives, épilepsie) aux conséquences dévastatrices chez l'homme. Les réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire, et qui sont affectés dans ces pathologies, impliquent des interactions entre des types distincts de neurones. Dans ce projet, nous allons utiliser des techniques de biologie moléculaire (optogénétique) permettant de manipuler l'activité de populations neuronales spécifiques afin de mieux comprendre comment ils contrôlent les circuits impliqués dans la mémoire.

Les avantages escomptés sont une meilleure compréhension du fonctionnement cérébral et de ses pathologies (neurodéveloppementales, neurodégénératives, épilepsie), ce qui représente un intérêt sociétal considérable.

Ce projet respecte les principes de la règle des 3R :

Remplacer : L'étude des propriétés des circuits neuronaux impliqués dans la cognition nécessite l'observation et la manipulation de systèmes neuronaux intacts, et ne peut donc se faire que sur l'animal vivant. Il est en effet à ce stade de nos connaissances impossible de modéliser de façon réaliste le fonctionnement cognitif in vitro ou in silico. Nous avons opté pour l'utilisation du rat et de la souris car ces rongeurs présentent le meilleur équilibre entre les bénéfices (accessibilité expérimentale et pertinence par rapport aux pathologies chez l'homme) et les dommages escomptés (souffrance liées aux conditions d'élevage ou d'expérimentation).

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaires pour garantir un pouvoir statistique suffisant pour chacune de nos expériences est ici de 20 rats et 100 souris, répartis sur une période de projet de 5 années.

Raffiner : Les animaux utilisés sont des rats et des souris, dont certaines de lignées transgéniques qui expriment un marqueur moléculaire permettant de cibler spécifiquement les neurones du type

d'intérêt, et de leur faire exprimer des molécules nous permettant de contrôler expérimentalement leur activité. Il devient ainsi possible de tester des hypothèses quant au rôle de ces neurones dans le circuit de façon causale (que se passe-t-il quand les réponses de ces neurones sont expérimentalement activées ou au contraire bloquées) et non plus seulement corrélative. Les marqueurs moléculaires spécifiques des lignées utilisées n'ont pas d'incidence sur la physiologie, en dehors des strictes périodes de manipulation de l'activité des neurones, et le phénotype des animaux est donc sans conséquence sur leur bien-être. Des éléments d'enrichissement (les animaux sont élevés en cages collectives, autant que possible, selon des normes qui respectent leur besoin d'interactions sociales, et le milieu est enrichi avec du matériel de construction du nid) sont introduits dans les cages d'élevage pour pallier à la monotonie des conditions d'élevage en laboratoire. Pour prévenir, détecter et corriger les conditions de mal-être éventuel, les animaux sont suivis de façon très régulière par du personnel spécialisé, formé et sensibilisé au bien-être animal, qui utiliseront des points limites spécifiques et des critères d'arrêt quand cela sera nécessaire. Au cours des procédures, la douleur sera prise en charge par des anesthésiques et des antalgiques adaptés à ces espèces.

12867 Le but de ce projet pilote est de produire des anticorps pour développer des outils thérapeutiques dans la lutte contre certains cancers.

Notre laboratoire travaille sur des protéines d'enveloppe de rétrovirus endogènes, appelées syncytines, découvertes dans plusieurs espèces animales. Les syncytines interagissent avec des récepteurs spécifiques situés à la surface cellulaire, et provoquent la fusion des cellules entre-elles. L'interaction syncytin/récepteur présente un intérêt appliqué important, par le biais de l'élaboration de nouveaux vecteurs viraux d'applications thérapeutiques dans le cancer. En effet, des récepteurs de syncytines dont l'expression est fortement activée dans différents types de tumeurs (antigène tumoraux), ont été identifiés. Notre objectif est maintenant d'élaborer des vecteurs viraux ("oncovirus") utilisant ces syncytines pour cibler ces cellules cancéreuses et provoquer leur élimination. Pour développer ce projet, nous avons besoin d'anticorps capables de reconnaître les protéines de syncytines produites par les vecteurs viraux. Or, de tels anticorps ne sont pas commercialisés, car les gènes de syncytine employés sont issus d'espèces non couramment ciblées (rongeurs non-murins, lézards, etc.).

Dans ce projet, nous cherchons donc à produire des anticorps polyclonaux contre les protéines d'intérêt après immunisation chez la souris.

L'antigène d'intérêt sera injecté en présence d'adjuvant afin d'augmenter la réponse immunitaire (comme dans un vaccin). La réponse primaire à cette première stimulation étant généralement de faible intensité, des rappels seront réalisés. Les anticorps contenus dans le sérum de l'animal seront récupérés lors des rappels par prises de sang puis au terme du protocole. Les mesures suivantes seront mises en place pour respecter la règle des 3R.

Remplacer : L'immunité humorale correspond à un processus complexe impliquant différents acteurs du système immunitaire de l'organisme entier. Ce processus se traduit par la production d'un répertoire diversifié d'immunoglobulines répondant à un grand nombre d'antigènes. Dans l'organisme vivant, l'adaptation accrue du système immunitaire vis à vis de l'antigène au fur et à mesure des immunisations permet d'obtenir des anticorps notablement plus spécifiques et pertinents que ceux obtenus avec des systèmes de production in vitro. Faire appel au modèle animal est donc incontournable à ce stade.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum (4 lots de 10 souris, soit au maximum 40 souris pour le projet) tout en conservant un nombre suffisant d'individus pour pouvoir tester la réponse immunitaire des souris contre différentes protéines de syncytines.

Raffiner : Toutes les procédures seront faites sous anesthésie et les animaux sont hébergés en milieu enrichi. Les animaux seront particulièrement suivis pendant les 24h suivant les injections, puis quotidiennement pour examiner leur état de santé. Les prélèvements réalisés, sous anesthésie, concerneront de faibles volumes afin de ne pas induire de souffrance chez l'animal.

12868 La sclérose tubéreuse de Bourneville (STB) est une maladie génétique principalement caractérisée par des troubles du développement dont un retard mental avec autisme, en partie due à une épilepsie précoce survenant dans les premières années de la vie, qui se traduit par des crises et une activité cérébrale anormale entre les crises.

Depuis plus de dix ans il existe une lignée de souris hétérozygote (Tsc1+/-) porteuse d'une délétion du gène TSC1, responsable de la maladie de Bourneville. Ces souris sont connues pour avoir une épilepsie, entre 12 et 18 jours de vie postnatale (p12-p18), et des troubles cognitifs, ces derniers persistant à l'âge adulte. L'épilepsie est supposée résulter d'une surexpression de GluN2C. Notre hypothèse est que les troubles cognitifs résultent de la même cause que l'épilepsie. Il est possible que l'épilepsie elle-même contribue à l'aggraver.

Nous avons synthétisé de nouveaux composés inhibiteurs sélectifs des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2C exprimé excessivement chez les souris Tsc1 et contribuant à l'épileptogénèse. Ces composés sont susceptibles de réduire l'activité épileptique et modifier l'activité cérébrale intercritique. Nous devons maintenant nous assurer que cette molécule pourrait améliorer les troubles cognitifs. Nous ferons les tests cognitifs uniquement pour la molécule active sur l'activité épileptique précédemment démontrée sur les enregistrements in vivo d'électroencéphalogramme (EEG). Dans une première étape, 12 souris Tsc1+/- et 12 souris WT auront des tests cognitifs afin de vérifier la reproductibilité des résultats publiés par d'autres équipes. Dans une seconde étape, les tests cognitifs seront réalisés à l'âge adulte entre 1 et 2 mois, une heure après administration de la molécule, chez 12 souris Tsc1+/-, et 12 souris Tsc1+/- recevant le même volume de sérum physiologique. Dans une troisième étape, afin de prévenir les troubles cognitifs dus à l'épilepsie précoce, les tests cognitifs seront réalisés chez 12 souris Tsc1+/- âgées de 1-2 mois ayant reçu la molécule entre P13 et P17 avec pour contrôle, 12 souris Tsc1+/- de même âge ayant reçu le même volume de sérum physiologique entre P13 et P17. Au total, 72 souris seront étudiées. Le test choisi, après la revue de la littérature, pour évaluer les fonctions cognitives (le conditionnement de peur) chez nos souris consiste à associer une légère stimulation électrique à un son afin d'induire une réponse de peur conditionnée au son seul. C'est le modèle le plus employé dans la littérature, mais également celui qui permet de mieux appréhender les déficits de la mémoire d'extinction à long terme. Cette procédure présente l'avantage d'être employée d'une manière quasi identique en médecine expérimentale et chez l'homme.

Nous testerons également l'interaction sociale sur les seules femelles parce que les mâles expriment souvent de l'agressivité ou un comportement sexuel en présence d'un intrus. Après 15 minutes d'adaptation, la souris « stimulus » sera mise dans la cage pour 2 minutes. Le temps passé par la souris test à explorer la souris « stimulus » sera mesuré par l'expérimentateur ignorant le statut génétique la souris test (transgénique versus sauvage). Une différence entre les souris Tsc1+/- et des souris sauvages a été rapportée pour ces 2 tests, sans traitement préalable.

Tout au long de ces études in vivo, nous respecterons la règle des 3R. Nous nous limiterons aux seules expériences qui sont indispensables.

Remplacer : Le remplacement de cette étude n'est pas possible car elle est le seul critère acceptable avant d'arriver en clinique humaine, et la cognition ne peut être étudiée autrement.

Réduire : Nous recherchons l'économie maximum des animaux, en réduisant au minimum les tests utilisés et choisissant ceux qui sont significativement différents selon la littérature et en commençant par une étude de reproductibilité de ces tests chez nos souris Tsc1+/- versus WT. La molécule testée ne sera administrée en préventif qu'après validation d'une différence significative de comportement et de mémoire entre souris Tsc1+/- et WT. Nous nous limiterons dans cette étude à une seule molécule à administrer en ne sélectionnant que celle qui a montré de résultats prometteurs lors des EEG in vivo.

Raffiner : Nous cherchons le moyen de réduire au minimum la durée de l'étude, le nombre d'animaux et la souffrance à laquelle ils sont soumis. Avant toute expérimentation, des points limites seront définis. Des critères d'arrêt seront appliqués. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de s'assurer de leur bien-être.

12869 Le cancer constitue un problème de santé publique majeur. La compréhension des mécanismes mis en jeu dans la progression tumorale et la mise au point de nouvelles stratégies tumorales font partie des grands enjeux scientifiques actuels. Parmi les mécanismes mis en jeu, l'angiogenèse (la formation de nouveaux vaisseaux sanguins) joue un rôle majeur dans la croissance tumorale, la dissémination métastatique et la réponse aux traitements. Par ailleurs, le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas encore possible dans le domaine de l'oncologie. En effet, le développement d'une tumeur et de sa vascularisation sont des mécanismes complexes impliquant l'interaction entre de nombreux types cellulaires (cellules tumorales, endothéliales, etc.) et nombreux composants de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, protéoglycanes, etc.), qui, pour être modélisés sur de réelles bases physiologiques et structurales, nous obligent de réaliser ces études chez l'animal. Par ailleurs l'évaluation de traceurs en médecine nucléaire (utilisés pour le diagnostic et le suivi de l'évolution des pathologies après leurs prises en charge) nécessite également l'utilisation d'animaux pour valider leurs utilisations en oncologie. La réalisation de ce protocole nécessitera au maximum 280 souris. Il s'agit là d'une appréciation globale du nombre d'animaux mais les expérimentations seront menées sous forme de séries consécutives afin d'ajuster le nombre d'animaux nécessaires en fonction des résultats observés (Réduction). Le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur, imagerie), et mises à mort dès lors que l'un des points limites ultimes sera atteint (Raffinement). De plus, nous utiliserons des techniques d'imagerie non invasive permettant de réduire les souffrances de l'animal (Raffinement) et le nombre d'animaux (Réduction). La réalisation de ce projet d'expérimentation animale permettra de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans la dissémination métastatique et d'évaluer le potentiel de certains traceurs utilisés en imagerie TEP (tomographie par Emission de Positons) pour le diagnostic et la prise en charge de cancers mammaires.